

**ANA CAROLINA DE LIMA TAVARES**

**Actividade antimicrobiana do *Vaccinium  
cylindraceum*: estudo da resposta e adaptação  
ao stress por Citometria de Fluxo**

Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar



UNIVERSIDADE DOS AÇORES  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
ANGRA DO HEROÍSMO, 2011



**ANA CAROLINA DE LIMA TAVARES**

**Actividade antimicrobiana do *Vaccinium  
cylindraceum*: estudo da resposta e adaptação  
ao stress por Citometria de Fluxo**

Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador

Professora Doutora Maria Graça da Silveira



UNIVERSIDADE DOS AÇORES

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ANGRA DO HEROÍSMO, 2011

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar o meu profundo agradecimento a algumas pessoas que, de uma forma ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho:

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Graça da Silveira, por todos os seus ensinamentos, pela ideia que deu origem a este trabalho, por todo o apoio para o seu desenvolvimento, e pela revisão deste trabalho.

Ao Professor Doutor Artur da Câmara Machado, director do Centro de Biotecnologia dos Açores, por ter permitido a realização deste trabalho no Centro de Biotecnologia dos Açores.

Ao Serviço e Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, muito especialmente à Doutora Cidália Pina-Vaz, ao Doutor Acácio Rodrigues e à Ana Isabel Ramos, pela simpatia, acolhimento e toda a ajuda prestada durante a minha estadia neste Serviço.

Ao Alexandre Salvador, um grande professor e amigo que, apesar da distância e vida atarefada que tem, arranjou sempre tempo para me ajudar no que fosse preciso. Sem a sua preciosa ajuda, fazer este trabalho teria sido muito mais difícil.

À Sara Luna, grande companheira neste percurso, por toda a ajuda nos momentos de maior “aperto”, pelos momentos de discussão e *brainstorming*, assim como por tornar os serões menos monótonos. Ela foi uma grande companheira de trabalho, espero tê-la ajudado tanto como ela a mim.

Aos colegas do Centro de Biotecnologia dos Açores, por todo o apoio e amizade demonstrados ao longo deste tempo.

À minha família, pelo constante apoio, incentivo e compreensão ao longo de todo este tempo.

Ao Cláudio, pelo constante apoio, especialmente nos momentos difíceis, pelo incentivo e pela revisão deste trabalho.

## ERRATA

Página	Linha	Onde se lê	Deve ler-se
2	16	“...reveals...”	“revealed...”
5	9	“...uva-da-serra, uva-do-mato ou rosmaninho...”	“...uva-da-serra ou uva-do-mato ...”
12	14	“...Burdulis <i>et al.</i> , 2009;)...”	“...Burdulis <i>et al.</i> , 2009)...”
30	20	“...4,6...”	“...4,06...”
44	23	“...fisiológicas...”	“...fisiológicos...”
46	12	“...é aeróbio...”	“... possui cadeia transportadora de electrões...”
47	19	“...de sua membrana...”	“...da sua membrana...”
48	12	“... entradas de moléculas...”	“... entrada de moléculas...”
54	10	“Fitzgeral”	“Fitzgerald”
57	11	“... cell sorting 42...”	“... cell sorting. Journal of Microbiological Methods 42...”

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	IV
ÍNDICE DE QUADROS .....	VII
RESUMO.....	1
ABSTRACT .....	2
ABREVIATURAS.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	6
2.1. Conservação dos alimentos .....	6
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	7
2.3. Produtos naturais com actividade antimicrobiana .....	9
2.3.1. Actividade antimicrobiana dos frutos tipo baga .....	11
2.3.2. <i>Vaccinium</i> .....	12
2.4. Stress e resposta ao stress dos microrganismos .....	14
2.5. Heterogeneidade da resposta ao stress.....	16
2.5.1. Citometria de fluxo .....	17
2.5.2. Fluorocromos.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	24
3.1. Caracterização das amostras.....	24
3.2. Preparação dos extractos .....	24
3.3. Estirpes bacterianas.....	25
3.4. Actividade antimicrobiana .....	25
3.5. Adaptação e stress.....	26
3.6. Contagem de colónias.....	26
3.7. Preparação das suspensões celulares.....	26
3.8. Marcação das células com carboxifluoresceína diacetato (cFDA) .....	27

3.9. Marcação com iodeto de propídio (IP) .....	27
3.10. Avaliação do efluxo de cF .....	28
3.11. Análise por CMF .....	28
4. RESULTADOS .....	29
4.1. Actividade antimicrobiana .....	29
4.2. Definição das populações .....	31
4.3. Caracterização do estado fisiológico.....	33
4.4. Comparação entre contagens por CMF e contagens em placa .....	37
4.5. Avaliação da actividade metabólica .....	38
4.6. Difusão de cF induzida por <i>V. cylindraceum</i> .....	40
4.7. Efeito do local de crescimento das bagas de <i>V. cylindraceum</i> na actividade observada .....	41
5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÃO .....	49
7. BIBLIOGRAFIA.....	50
8. ANEXOS.....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Configuração de um citómetro de fluxo .....	19
<b>Figura 2.2.</b> Estrutura química do fluorocromo IP .....	21
<b>Figura 2.3.</b> Estrutura química do substrato não fluorescente cFDA (A) e do composto fluorescente cF resultante da sua esterificação (B) .....	22
<b>Figura 3.1.</b> <i>Vaccinium cylindraceum</i> . Exemplo de um arbusto (A) e pormenor das bagas (B) .....	24
<b>Figura 3.2.</b> Moinho utilizado para triturar as bagas congeladas .....	25
<b>Figura 4.1.</b> Efeito das várias concentrações de extracto aquoso de <i>V. cylindraceum</i> na taxa de crescimento de <i>S.aureus</i> , determinado a partir da leitura da OD <sub>595</sub> .....	29
<b>Figura 4.2.</b> Efeito do extracto de <i>V. cylindraceum</i> na viabilidade celular avaliada através da contagem do número de ufc/ml na condição de crescimento na presença de 60 mg/ml de extracto (A) e aplicação de 160 mg/ml de extracto (B) .....	30
<b>Figura 4.3.</b> <i>Dotplots</i> FSC vs SSC da cultura de <i>S. aureus</i> crescida na ausência de extracto (I) e posteriormente sujeita à acção de 160 mg/ml de extracto durante 1h (II) e crescida na presença de 60 mg/ml de extracto (III) e posteriormente sujeita à acção de 160 mg/ml de extracto durante 1h (IV) .....	32
<b>Figura 4.4.</b> Análise do tamanho das células avaliado por histogramas de células de <i>S. aureus</i> obtidos por CMF (A) e pela coloração Gram (B), relativamente às células crescidas na ausência de extracto (I) e sujeitas à acção de 160 mg/ml de extracto durante 1h (II), e células crescidas na presença de 60 mg/ml de extracto (III) e sujeitas à acção de 160 mg/ml de extracto durante 1h (IV) (Barra de escala= 2 µm) .....	33
<b>Figura 4.5.</b> Histogramas de células de <i>S. aureus</i> crescidas na ausência de extracto (A) e na presença de 60 mg/ml de extracto durante 10h (B) e marcadas com cF. As células foram recolhidas por centrifugação, lavadas com tampão NaPi 50 mM (pH 7,4) e posteriormente stressadas com 160 mg/ml de	



extracto durante 1h (linha roxa). (Linha sólida divide células consideradas não marcadas e marcadas)..... 34

**Figura 4.6.** Histogramas de células de *S. aureus* crescidas na ausência de extracto (I) e na presença de 60 mg/ml de extracto durante 10h (III) e marcadas com IP. As células foram recolhidas por centrifugação, lavadas com tampão NaPi 50 mM (pH 7,4) e posteriormente stressadas com 160 mg/ml de extracto durante 1h (II e IV). (Linha sólida divide células consideradas não marcadas e marcadas) ..... 35

**Figura 4.7.** Efeito do extracto aquoso de *V. cylindraceum* em células de *S. aureus* avaliado pela retenção de cF e exclusão de IP. As células foram crescidas na ausência (A) e na presença de 60 mg/ml de extracto (B), recolhidas por centrifugação, lavadas com tampão NaPi 50 mM (pH 7,4) e stressadas com 160 mg/ml de extracto durante 1h..... 36

**Figura 4.8.** Efeito do extracto aquoso de *V. cylindraceum* em células de *S. aureus* avaliado pela dupla marcação com cF e IP de células crescidas na ausência (A) e na presença (B) de extracto. Marcações da cultura controlo (I), posteriormente stressada com 160 mg/ml de extracto durante 1h (II); e da cultura crescida na presença de 60 mg/ml de extracto durante 10h (III) e posteriormente stressada com 160 mg/ml de extracto durante 1h (IV) ..... 37

**Figura 4.9.** Comparação entre viabilidade avaliada por ufc e as contagens por CMF de células de *S. aureus* marcadas com cF (A) e IP (B)..... 38

**Figura 4.10.** Análise por CMF do efluxo de cF em células de *S.aureus* marcadas por incubação com 50 µM cFDA. O efluxo de cF foi medido em suspensão de células (em tampão NaPi, 50 mM, pH 7,4) energizadas com glucose (símbolos preenchidos) e desenergizadas (símbolos não preenchidos), em células não stressadas (controlo), e células stressadas com 160 mg/ml e 320 mg/ml de extracto aquoso durante 1h ..... 39

**Figura 4.11.** Análise por CMF do efluxo de cF em células de *S.aureus* marcadas por incubação com 50 µM cFDA. O efluxo de cF foi medido em suspensão de células (em tampão NaPi, 50 mM, pH 7,4) energizadas com glucose (símbolos preenchidos) e desenergizadas (símbolos não preenchidos), em células crescidas na presença de 60 mg/ml de extracto durante 10h

(controlo), e posteriormente stressadas com 160 mg/ml de extracto aquoso durante 1h ..... 40

**Figura 4.12.** Análise por CMF do efluxo de cF em células de *S.aureus* induzido pelo extracto de *V. cylindraceum*. *Dotplots* de SSC vs FL1 de suspensão de células desenergizadas (em tampão NaPi 50 mM, pH 7,4) marcadas com cF e incubadas a 37 °C na presença de 160 mg/ml de extracto. As amostras foram retiradas imediatamente após a adição de extracto e passados 30 min de incubação. A retenção de cF foi analisada em células crescidas na ausência (A) e presença de 60 mg/ml de extracto aquoso (B) ..... 41

**Figura 4.13.** Análise por CMF do efluxo de cF em células de *S.aureus* marcadas por incubação a 37°C com 50 µM cFDA. O efluxo de cF foi medido em suspensão de células (em tampão NaPi, 50 mM, pH 7,4) energizadas com glucose (símbolos preenchidos) e desenergizadas (símbolos não preenchidos), em células não stressadas (controlo), e células stressadas durante 1h, com 160 mg/ml de extracto aquoso proveniente das Furnas do Enxofre e do Algar do Carvão..... 42

**Figura 4.14.** Análise por CMF do efluxo de cF em células de *S.aureus* induzido pelo extracto de *V. cylindraceum*. *Dotplots* de SSC vs FL1 de suspensão de células desenergizadas (em tampão NaPi 50 mM, pH 7,4) marcadas com cF e incubadas a 37 °C na presença de 160 mg/ml de extracto. As amostras foram retiradas imediatamente após a adição de extracto e passados 30 min de incubação. A retenção de cF foi analisada em células tratadas com 160 mg/ml de extracto proveniente das Furnas do Enxofre (A) e do Algar do Carvão (B). 43

**Figura 1.** Efeito do extracto de *V. cylindraceum* na viabilidade celular avaliada através da contagem do número de ufc/ml na condição de aplicação de 160 mg/ml e 320 mg/ml de extracto ..... 62

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Efeito do extracto aquoso de <i>V. cylindraceum</i> em células de <i>S. aureus</i> avaliado pela retenção de cF e exclusão de IP. As células foram crescidas na ausência e na presença de 60 mg/ml de extracto, recolhidas por centrifugação, lavadas com tampão NaPi 50 mM (pH 7,4) e stressadas com 160 mg/ml de extracto durante 1 h.....	61
<b>Quadro 2.</b> Efeito do extracto aquoso de <i>V. cylindraceum</i> no crescimento de <i>S. aureus</i> , expresso em percentagem de células marcadas com cF e IP. Os valores obtidos foram utilizados para comparação com as contagens em placa .....	61
<b>Quadro 3.</b> Efeito do extracto aquoso de <i>V. cylindraceum</i> no crescimento de <i>S. aureus</i> , expresso em log <sub>10</sub> ufc/ml.....	62
<b>Quadro 4.</b> Análise por CMF do efluxo de cF em células de <i>S.aureus</i> marcadas por incubação com 50 µM cFDA. O efluxo de cF foi medido em suspensão de células (em tampão NaPi, 50 mM, pH 7,4) energizadas com glucose, não stressadas (controlo), e células stressadas com 160 mg/ml e 320 mg/ml de extracto aquoso durante 1h.....	63
<b>Quadro 5.</b> Análise por CMF do efluxo de cF em células de <i>S.aureus</i> marcadas por incubação com 50 µM cFDA. O efluxo de cF foi medido em suspensão de células (em tampão NaPi, 50 mM, pH 7,4) desenergizadas, não stressadas (controlo), e células stressadas com 160 mg/ml e 320 mg/ml de extracto aquoso durante 1h .....	63
<b>Quadro 6.</b> Análise por CMF do efluxo de cF em células de <i>S.aureus</i> marcadas por incubação com 50 µM cFDA. O efluxo de cF foi medido em suspensão de células (em tampão NaPi, 50 mM, pH 7,4) energizadas com glucose, crescidas na presença de 60 mg/ml de extracto durante 10h (controlo), e posteriormente stressadas com 160 mg/ml de extracto aquoso durante 1h .....	64
<b>Quadro 7.</b> Análise por CMF do efluxo de cF em células de <i>S.aureus</i> marcadas por incubação com 50 µM cFDA. O efluxo de cF foi medido em suspensão de células (em tampão NaPi, 50 mM, pH 7,4) desenergizadas, crescidas na	

presença de 60 mg/ml de extracto durante 10h (controlo), e posteriormente stressadas com 160 mg/ml de extracto aquoso durante 1h ..... 64

**Quadro 8.** Análise por CMF do efluxo de cF em células de *S.aureus* marcadas por incubação a 37°C com 50 µM cFDA. O efluxo de cF foi medido em suspensão de células (em tampão NaPi, 50 mM, pH 7,4) energizadas com glucose, não stressadas (controlo), e células stressadas durante 1h, com 160 mg/ml de extracto aquoso proveniente das Furnas do Enxofre e do Algar do Carvão ..... 65

**Quadro 9.** Análise por CMF do efluxo de cF em células de *S.aureus* marcadas por incubação a 37°C com 50 µM cFDA. O efluxo de cF foi medido em suspensão de células (em tampão NaPi, 50 mM, pH 7,4) desenergizadas, não stressadas (controlo), e células stressadas durante 1h, com 160 mg/ml de extracto aquoso proveniente das Furnas do Enxofre e do Algar do Carvão .... 65

## RESUMO

Actualmente verifica-se uma crescente preocupação relativamente aos conservantes sintéticos, e um número cada vez maior de consumidores opta por alimentos que contenham ingredientes naturais, ou seja, compostos com actividade antimicrobiana. Assim, o presente trabalho teve como objectivo o estudo da resposta ao stress e adaptação de células de *Staphylococcus aureus*, um dos patógenos responsável pela contaminação cruzada dos alimentos, ao extracto de *Vaccinium cylindraceum*, uma baga endémica dos Açores. O efeito do extracto nas células individuais de *S. aureus* foi estudado usando a capacidade de células desenergizadas em reter eficientemente a carboxifluoresceína (cF) como um indicador de actividade enzimática e de integridade da membrana, e a sua extrusão por transporte activo quando as células foram energizadas com glucose, como um indicador da capacidade de gerar energia metabólica. Verificou-se que o extracto de *V. cylindraceum* afecta a actividade metabólica das células de *S. aureus*, e que danifica a membrana citoplasmática, sugerindo que a dissipação do gradiente de membrana pode ser em parte responsável pela menor eficiência das células em gerar energia. A análise multiparamétrica por citometria de fluxo (CMF) de células de *S. aureus* crescidas na presença de extracto revelou que a população é heterogénea quanto à sua tolerância ao extracto de *V. cylindraceum*, tendo-se observado uma sub-população que se tornou mais robusta mantendo a integridade da membrana. No entanto, esta resposta adaptativa não foi evidente no que se refere à actividade metabólica destas células de *S. aureus* stressadas com *V. cylindraceum*. A análise por CMF de células marcadas com carboxifluoresceína diacetato (cFDA) e iodeto de propídio (IP) revelaram três subpopulações, i.e. células intactas (cF-fluorescentes), células danificadas (IP-fluorescentes) e células permeáveis (IP e cF-fluorescentes). Além do interesse fundamental subjacente à elucidação dos mecanismos envolvidos na resposta ao stress e adaptação de *S. aureus* ao extracto de *V. cylindraceum* alcançados no presente trabalho, fornecemos um método rápido para avaliar o estado fisiológico de células individuais de *S. aureus*, o que representa uma técnica poderosa para a indústria em termos de segurança alimentar.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*, citometria de fluxo, actividade antimicrobiana, *Vaccinium cylindraceum*, stress, adaptação.

## ABSTRACT

The growing concern about synthetic preservatives leads to a growing number of consumers that require foods which contain natural ingredients, i.e., natural compounds with antimicrobial activity. Thus, the goal of the present work was to study the stress response and adaptation of *Staphylococcus aureus* cells, one of the pathogens responsible for food cross-contamination, to the extract of *Vaccinium cylindraceum*, an endemic berry from the Azores. The extract effects on *S. aureus* single cells was evaluated using the ability of de-energized cells to retain efficiently carboxyfluorescein (cF), as an indicator of enzymatic activity and membrane integrity, and the energy-dependent efflux of cF as an indicator for metabolic energy generation. *V. cylindraceum* extract clearly affected the metabolic activity of *S. aureus* cells and damaged the cytoplasmic membrane, suggesting that the dissipation of the proton motive force may be responsible for the less efficiency of cells in generating energy. Multiparametric flow cytometry (FCM) analysis of *S. aureus* cells grown in the presence of extract reveals a more robust sub-population, capable of maintaining membrane integrity. However this adaptive response was not observed in which regards the metabolic activity of *V. cylindraceum* stressed cells. FCM analysis of cells stained with carboxyfluorescein diacetate (cFDA) and propidium iodide (PI) revealed three sub-populations, i.e., intact cells (cF-fluorescent), damaged cells (PI-fluorescent) and cells permeable (PI and cF-fluorescent). Besides the fundamental interest underlying the elucidation of mechanisms involved in the stress response and adaptation of *S. aureus* cells to *V. cylindraceum* achieved in this work, it provides a rapid method to assess the physiological state of *S. aureus* single cells, representing a powerful technique for the industry in terms of food safety.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, flow cytometry, antimicrobial activity, *Vaccinium cylindraceum*, stress, adaptation.

## ABREVIATURAS

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ARN – Ácido ribonucleico

ATCC – American Type Culture Collection

ATP – Adenosina Trifosfato

$a_w$  – Actividade da água

cF - Carboxifluoresceína

cFDA – Carboxifluoresceína diacetado

CMF – Citometria de Fluxo

CN – Caldo nutritivo

FACS – Fluorescence Activated Cell Sorter

FSC – Forward Scatter Channel

g - Grama

IP – Iodeto de Propídio

NaPi – Fosfato de Sódio

nm – Nanómetro

$\mu\text{g}$  – Micrograma

$\mu\text{l}$  – Microlitro

ml - Mililitro

$\mu\text{m}$  – Micrómetro

rpm – Rotações por minuto

OD – Densidade óptica (Optical Density)

$R^2$  – Coeficiente de correlação

SSC – Side scatter channel

TA – Temperatura ambiente

ufc – Unidades formadoras de colónias

## 1. INTRODUÇÃO

A deterioração dos alimentos devido ao crescimento microbiano constitui ainda um problema difícil de controlar, apesar das tecnologias de conservação alimentar existentes (Rauha *et al.*, 2000).

Actualmente verifica-se uma grande preocupação relativamente ao uso de conservantes sintéticos, e conseqüentemente um número cada vez maior de consumidores opta por alimentos que contenham ingredientes naturais, o que desencadeou um interesse crescente em relação a novos compostos naturais com actividade antimicrobiana (Brul e Coote, 1999; Casp e Abril, 1999; Rauha *et al.*, 2000; Agatemor, 2009; Wu *et al.*, 2009). Têm sido realizados diversos estudos sobre a actividade antimicrobiana de extractos de plantas e especiarias, concluindo que estes possuem actividade contra um largo espectro de bactérias (Kivanc *et al.*, 1991; Burdulis *et al.*, 2009).

Os frutos tipo baga, entre os quais os do género *Vaccinium*, possuem elevado valor comercial nos Estados Unidos da América e também nos países Nórdicos, pelas suas propriedades benéficas para a saúde (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005a). Estes frutos possuem uma grande variedade de compostos fitoquímicos, entre os quais as antocianinas, que contribuem grandemente para a sua actividade antimicrobiana (Kivanc *et al.*, 1991; Burdulis *et al.*, 2009). No entanto, a utilização de extractos naturais como conservantes alimentares levanta uma questão importante que é a da sua influência sobre as propriedades organolépticas, pelo que se espera que estes sejam adicionados em pequenas quantidades. Assim, a sua sucessiva aplicação pode influenciar a capacidade dos microrganismos sobreviverem e crescerem nos alimentos e conseqüentemente contribuir para o desenvolvimento de estirpes tolerantes a compostos naturais (Smid e Gorris, 2007).

Quando se considera a sobrevivência de microrganismos expostos a diferentes factores de stress, a heterogeneidade de estados metabólicos e fisiológicos existentes numa população microbiana revela-se, uma vez que nem todas as células sobrevivem de igual forma quando sujeitas a condições que representam um desafio para a célula (Jordan *et al.*, 1999; Booth, 2002). Deste



modo, a utilização de uma técnica que permita a análise de células individuais, como a citometria de Fluxo (CMF), fornece uma informação muito mais valiosa do que os dados obtidos através das técnicas de microbiologia clássicas que são relativos à cultura como um todo, ou seja, apresentam um valor médio de um determinado parâmetro, pressupondo que cada célula contribui de igual forma para o fenómeno observado (Kell *et al.*, 1991; Davey e Kell, 1996).

O *Vaccinium cylindraceum* é uma espécie endémica do arquipélago dos Açores, presente em todas as ilhas excepto na ilha Graciosa, e conhecido localmente como uva-da-serra, uva-do-mato ou rosmaninho (Schäfer, 2002), não existindo, de acordo com o conhecimento do autor, estudos relativamente às suas propriedades bioactivas. Assim, o presente trabalho teve como objectivo avaliar a actividade antimicrobiana do extracto aquoso dos frutos de *V. cylindraceum*, em relação a células individuais de um microrganismo patogénico de origem alimentar, o *Staphylococcus aureus*. Pretendeu-se, através da técnica de citometria de fluxo (CMF) associada aos fluorocromos 5(6)-carboxifluoresceína diacetato (cFDA) e iodeto de propídio (IP), compreender os mecanismos envolvidos na toxicidade e tolerância ao *V. cylindraceum*, através da caracterização do estado fisiológico de células individuais de *S. aureus*.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Conservação dos alimentos**

Durante o processamento dos alimentos é crucial que se garanta a sua segurança e estabilidade durante o seu prazo de validade (Brul e Coote, 1999). Para que tal aconteça, é necessária a inactivação/controlo dos microrganismos que compõem a sua microflora, que são os principais responsáveis pela deterioração dos alimentos (Casp e Abril, 1999).

Existem várias técnicas que podem ser utilizadas na conservação dos alimentos, como sejam a aplicação do calor (pasteurização e esterilização), a aplicação de frio (refrigeração e congelação), a diminuição da água disponível (desidratação, concentração, salga e fumagem) (Casp e Abril, 1999; Ray, 2005; Adams e Moss, 2008), ou a utilização de conservantes químicos, sendo os mais comuns os ácidos orgânicos fracos, como o acético, láctico, benzóico e sórbico, entre outros (Brul e Coote, 1999; Casp e Abril, 1999; Ray, 2005).

A utilização de conservantes, i.e. ácidos benzóico e sórbico, tornou-se uma prática generalizada na indústria alimentar uma vez que estes compostos eram muito eficazes a inibir o crescimento microbiano. Para valores de pH baixos os ácidos fracos encontram-se no estado indissociado e sem cargas, sendo capazes de penetrar na célula por difusão; já no seu interior, e ao encontrarem um pH mais elevado, os ácidos orgânicos fracos dissociam-se, libertando prótons e aniões que, por possuírem carga, não atravessam a membrana, diminuindo assim o pH e inibindo o metabolismo (Brul e Coote, 1999; Beales, 2004; Rahman, 2007). Estes ácidos inibem o crescimento dos microrganismos ao afectar a parede ou membrana celulares, enzimas metabólicas, ou o sistema de síntese de proteínas ou de material genético (Brul e Coote, 1999; Casp e Abril, 1999).

Actualmente, a utilização de novos métodos de conservação, como seja a tecnologia de barreiras, onde é utilizada a combinação de vários tratamentos sub-letais, com o objectivo de perturbar simultaneamente vários mecanismos

homeostáticos temporária ou permanentemente, permite a protecção dos alimentos relativamente a microrganismos patogénicos e responsáveis pela deterioração dos alimentos mantendo, ao mesmo tempo, as propriedades organolépticas do alimento, como seja a cor, sabor, textura e valor nutritivo (Brul e Coote, 1999; Casp e Abril, 1999; Yousef e Courtney, 2003). No entanto, tem-se tornado evidente que esta tecnologia poderá apresentar perigos no que se refere à sobrevivência e crescimento de patógenos de origem alimentar (Smid e Gorris, 2007).

## **2.2. *Staphylococcus aureus***

O *Staphylococcus aureus* foi descrito conclusivamente por Anton Rosenbach em 1884 (Freeman-Cook e Freeman-Cook, 2006), estando actualmente descritas 27 espécies e sete sub-espécies do Género *Staphylococcus* (Adams e Moss, 2008). É uma bactéria Gram-positiva, catalase positiva, oxidase negativa, anaeróbia facultativa, imóvel e não formadora de esporos, com forma cocóide e diâmetro de aproximadamente um  $\mu\text{m}$ , crescendo em aglomerados em forma de cachos (Adams e Moss, 2008). Cresce num intervalo de temperatura entre 7 e 48 °C, embora a temperatura óptima seja 37 °C (Jay, 2000; Ray, 2005; Adams e Moss, 2008). Possui a capacidade de crescer entre pH de 4,0 e 9,8, com um crescimento óptimo entre 6,0 e 7,0 (Jay, 2000; Adams e Moss, 2008).

Esta bactéria possui particular relevância a nível alimentar devido à sua elevada tolerância ao sal e a valores de  $a_w$  baixos, conseguindo crescer em concentrações de NaCl até 20%, tendo-se observado o seu crescimento a valores de  $a_w$  de 0,83, embora o valor de  $a_w$  reconhecido como mínimo seja de 0,86 (Jay, 2000; Adams e Moss, 2008).

A produção de toxina está associada sobretudo à espécie *S. aureus*, embora também tenha sido descrita em outras espécies, incluindo *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus hyicus* (Adams e Moss, 2008). A intoxicação causada pela toxina estafilocócica é uma doença de origem alimentar comum (Jay, 2000), mas normalmente sub-reportada pelo facto dos seus sintomas serem moderados e de curta duração (Adams e Moss, 2008). O intervalo de

temperatura no qual ocorre a produção de toxina é menor que aquele correspondente ao crescimento (10-45 °C), com um óptimo de 35-40 °C, sendo também afectada pelas condições anaeróbias. A toxina possui maior resistência às temperaturas elevadas que as células vegetativas de *S. aureus*, sendo pouco provável a sua inactivação pelo cozinhar dos alimentos ou pelos tratamentos térmicos de conservação utilizados comercialmente (Jay, 2000).

Este microrganismo pertence à flora normal dos humanos, particularmente nas superfícies mucosas, entre as quais as superfícies nasais, sendo que cerca de 20-50% dos adultos saudáveis possui colónias de *S. aureus* nos seus tractos nasais (Adams e Moss, 2008), pelo que é frequente a contaminação dos alimentos com *S. aureus* através dos manipuladores de alimentos, podendo os alimentos também ser contaminados através de lesões cutâneas infectadas, ou por tosse ou espirros (Adams e Moss, 2008). As carnes salgadas, como o fiambre, são particularmente vulneráveis, uma vez que o microrganismo não é afectado pelos níveis de sal que inibem grande parte da flora competitiva. Outros alimentos frequentemente responsáveis por surtos são queijos curados, sobremesas frias, cremes e doces recheados (Adams e Moss, 2008).

A intoxicação alimentar provocada por *S. aureus* é caracterizada por um período de incubação curto, cerca de duas a quatro horas, e o tempo de recuperação tem a duração de um a dois dias. Os sintomas predominantes são as náuseas, vômitos, cólicas e prostração, sendo que diarreia é também frequente (Ray, 2005; Adams e Moss, 2008). As toxinas A e D, isoladas ou combinadas, são as frequentemente implicadas nos surtos de intoxicações alimentares. Embora as toxinas produzidas por *S. aureus* sejam frequentemente descritas como enterotoxinas, estas são verdadeiramente neurotoxinas, porque actuam sobre os receptores intestinais que estimulam o nervo vago e o sistema simpático, provocando vômitos (Adams e Moss, 2008).

As causas mais frequentes de intoxicação alimentar consistem na refrigeração inadequada, preparação dos alimentos com muita antecedência, manipulação realizada por indivíduos infectados e com pouca higiene, preparação dos alimentos ou tratamento térmico inadequados, e manutenção dos alimentos em

equipamentos de aquecimento com temperaturas óptimas para o crescimento bacteriano (Jay, 2000).

### **2.3. Produtos naturais com actividade antimicrobiana**

Desde tempos remotos que as ervas são conhecidas pela sua actividade antimicrobiana (Juven *et al.*, 1994; Chang, 1995). Mais recentemente, extractos de plantas foram estudados e propostos como agentes antimicrobianos naturais para utilização na alimentação (Del Campo *et al.*, 2000; Hsieh, 2000; Hsieh *et al.*, 2001).

As plantas sintetizam uma grande variedade de metabolitos secundários, sendo estes maioritariamente compostos fenólicos (entre os quais os flavonóides), que actuam essencialmente na sua defesa e são normalmente sintetizados na resposta a várias condições de stress e acção de patógenos (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005a; Vatterm *et al.*, 2005; Nohynek *et al.*, 2006). Estes compostos variam de moléculas simples, com uma substituição no anel fenólico, a moléculas complexas polimerizadas com elevado peso molecular (Cowan, 1999; Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005a).

Os flavonóides apresentam diversos tipos de bioactividade, como seja actividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antialérgica, antiviral e antioxidante, sendo que vários grupos de investigação já procederam ao isolamento e identificação da estrutura dos flavonóides que possuem actividade antibacteriana (Cushnie e Lamb, 2010). De acordo com vários estudos revistos por Cushnie e Lamb (2010), os mecanismos de acção dos vários flavonóides consistem na inibição da síntese de ácidos nucleicos, perturbação da membrana citoplasmática, e inibição do metabolismo energético.

As antocianinas, pertencentes a esta família, são pigmentos hidrossolúveis largamente distribuídos nos frutos, responsáveis pelas suas cores características, e estão envolvidas em várias actividades biológicas benéficas para a saúde, por possuírem propriedades antioxidante e antimicrobiana (Burdulis *et al.*, 2009). Outros compostos fenólicos também presentes são os taninos, polímeros de flavonóides complexos hidrossolúveis, que são

responsáveis pelo sabor adstringente característico de muitos frutos devido à sua capacidade de precipitar proteínas presentes na boca (Santos-Buelga e Scalbert, 2000; Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005b). Os mecanismos de acção antimicrobiana destes últimos compostos poderão estar relacionados com a sua capacidade de inactivar adesinas, enzimas e proteínas de transporte do envelope celular dos microrganismos (Cowan, 1999).

Os óleos essenciais são compostos aromáticos amplamente utilizados nos alimentos, como aromatizantes, sendo constituídos por um elevado número de componentes. Por serem hidrofóbicos, os óleos essenciais são capazes de se incorporar na membrana celular e nas mitocôndrias, permeabilizando-as, pelo que o mais provável é que o seu mecanismo de acção antimicrobiana envolva vários alvos da célula bacteriana. A sua actividade antimicrobiana é beneficiada em situações de pH, temperatura e níveis de oxigénio baixos (para uma revisão, consultar Burt, 2004).

Têm sido realizados diversos estudos acerca da actividade de extractos de plantas contra diversas bactérias. Agatemor (2009), ao estudar a actividade antimicrobiana de extractos aquosos e alcoólicos de nove especiarias, verificou que todos os extractos aquosos, excepto o de *Vanilla fragran*, inibiram o crescimento de *S. aureus*. Akroum *et al.* (2009) estudaram as actividades antimicrobiana, antioxidante e citotóxica de 16 plantas algerianas e verificaram que os extractos foram mais activos contra bactérias Gram-positivas, tendo o *S. aureus* sido inibido pelos extractos metanólicos de todas as plantas.

Existem vários estudos que testaram a actividade antimicrobiana de diferentes óleos essenciais e essências de plantas em relação a vários microrganismos, entre os quais *S. aureus*, tendo-se verificado que este foi sensível aos óleos essenciais de eucalipto, alecrim, manjerona, hortelã e salva (Smith-Palmer *et al.*, 1998). Noutro trabalho idêntico verificou-se que o crescimento de *S. aureus* foi inibido por todos os óleos essenciais testados, no entanto, alguns dos compostos, quando testados isoladamente (carvacrol metil ester, *R*(+)-limoneno, (+)-sabineno e  $\alpha$ -terpineno), não provocaram inibição do crescimento (Dorman e Deans, 2000).

O uso de compostos derivados de plantas, tais como extractos de frutos ou óleos essenciais, como inibidores do crescimento de microrganismos em alimentos, é muitas vezes limitado porque o sabor conferido aos alimentos poderá afectar as suas propriedades organolépticas (Pandit e Shelef, 1994; Brul e Coote, 1999), pelo que muitas vezes são utilizados em concentrações que apenas inibem mas não matam os microrganismos (Brul e Coote, 1999).

### **2.3.1. Actividade antimicrobiana dos frutos tipo baga**

Actualmente tem-se verificado um interesse crescente pelos frutos tipo baga, pois estes frutos, para além de conterem grandes quantidades de açúcar e pectinas (Zheng e Wang, 2003), constituem uma fonte de compostos bioactivos, tais como compostos fenólicos (flavonóides, ácidos fenólicos, linhanos e taninos poliméricos) e ácidos orgânicos que, para além de possuírem actividade antioxidante, possuem também actividade antimicrobiana contra vários patógenos humanos (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005a; Nohynek *et al.*, 2006).

De acordo com Puupponen-Pimiä *et al.* (2005a), a inibição do crescimento bacteriano pelos compostos fenólicos presentes nos frutos tipo baga deve-se a vários mecanismos de acção, tais como a desestabilização da membrana citoplasmática, inibição de enzimas extracelulares bacterianas, acções directas no metabolismo e privação dos substratos necessários para o crescimento. Segundo o mesmo autor, a actividade antimicrobiana destes frutos pode também estar relacionada com a sua capacidade de evitar a aderência das bactérias às células epiteliais, determinante para a colonização e infecção de muitos patógenos.

Os ácidos orgânicos, normalmente utilizados como acidulantes ou antioxidantes, possuem também actividade antimicrobiana, o que lhes confere um benefício adicional. Os principais ácidos orgânicos presentes nos frutos tipo baga são o málico e o cítrico (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2005b; Wu *et al.*, 2009; Rahbar e Diba, 2010), tendo como alvo as paredes e membranas celulares, enzimas metabólicas, sistemas de síntese de proteínas, e também o material genético (Smid e Gorris, 2007). A sua eficácia antimicrobiana reside, para além

da acidificação do citoplasma microbiano (Mitchell, 1961, 1972; Hugo, 1978, citados por Maillard, 2002; Wu *et al.*, 2008), como referido anteriormente, na dissipação do gradiente de membrana, do qual dependem o transporte activo e a fosforilação oxidativa (Mitchell, 1961, 1972; Hugo, 1978, citados por Maillard, 2002; Beales, 2004).

### **2.3.2. *Vaccinium***

Existem diversos estudos que demonstram que algumas espécies do género *Vaccinium* possuem actividade antimicrobiana contra um largo espectro de bactérias, como *Bacillus subtilis* (Rauha *et al.*, 2000; Akroum *et al.*, 2009; Burdulis *et al.*, 2009), *Bacillus cereus* (Nohynek *et al.*, 2006; Akroum *et al.*, 2009), *Escherichia coli* (Rauha *et al.*, 2000; Magariños *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008; Burdulis *et al.*, 2009; Lacombe *et al.*, 2010; Rahbar e Diba, 2010), *Pseudomonas aeruginosa* (Magariños *et al.*, 2008; Burdulis *et al.*, 2009;), *Listeria monocytogenes* (Magariños *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008; Burdulis *et al.*, 2009), e também *S. aureus* (Rauha *et al.*, 2000; Magariños *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008; Akroum *et al.*, 2009; Burdulis *et al.*, 2009).

A maioria dos estudos sobre a actividade antimicrobiana deste tipo de frutos restringe-se às técnicas de microbiologia clássicas, mas também existem alguns autores que aliam a essas técnicas a microscopia electrónica de transmissão (Wu *et al.*, 2008; Lacombe *et al.*, 2010) e técnicas de biologia molecular (Wu *et al.*, 2009). Estes estudos utilizam essencialmente extractos de compostos fenólicos desses frutos, ou das várias fracções dos seus compostos, isto é, estudam a actividade antimicrobiana dos flavonóides (antocianinas, flavonoles e flavanoles), dos ácidos fenólicos e também das proantocianinas, na maior parte das vezes preparados com metanol (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2001, 2005a, 2005b; Burdulis *et al.*, 2009; Rahbar e Diba, 2010). Nos casos do uso de extractos aquosos, estes são muitas vezes preparados a partir de concentrados comerciais do fruto (Wu *et al.*, 2008, Lacombe *et al.*, 2010).

Nos estudos realizados por Puupponen-Pimiä *et al.* (2001, 2005b), os extractos fenólicos de bagas de países nórdicos inibiram o crescimento de estirpes de



*Salmonella*, *E. coli* e *Staphylococcus*, mas não de estirpes de *Listeria* e *Lactobacillus*. Burdulis *et al.* (2009), ao estudarem a actividade antimicrobiana de extractos de frutos e casca de bagas oriundas da Lituânia, também verificaram a sensibilidade de *S. aureus* a estes extractos.

A utilização da microscopia electrónica de transmissão para avaliar os efeitos do concentrado de *Vaccinium macrocarpon* em relação a vários patógenos de origem alimentar, entre os quais *S. aureus*, revelou a ocorrência de danos ao nível da membrana e parede celulares, tendo sido também verificado que a actividade antimicrobiana do concentrado estava relacionada com a diminuição do pH, o que provoca a dissipação do gradiente de membrana, tornando as células mais susceptíveis aos compostos fenólicos existentes no concentrado (Wu *et al.*, 2008). Lacombe *et al* (2010), ao estudarem os efeitos das diferentes fracções do mesmo tipo de concentrado em relação a *E. coli* O157:H7, utilizando a mesma técnica, verificaram que a fracção dos açúcares e dos ácidos orgânicos causaram stress osmótico e que tanto os compostos fenólicos, em geral, como as antocianinas, em particular, causaram a desintegração da membrana externa. Além disso, confirmaram que o mecanismo antimicrobiano dos ácidos orgânicos depende fortemente do pH baixo, uma vez que se deixou de verificar o seu efeito para valores de pH próximos de 7.

Num estudo em que se avaliou a actividade antimicrobiana do sumo de *V. macrocarpon* Ait. em relação a diferentes microrganismos patogénicos, o *S. aureus* revelou-se o microrganismo mais sensível, enquanto a *L. monocytogenes* foi o microrganismo mais resistente (Margariños *et al.*, 2008).

O conhecimento do efeito que extractos de frutos tipo baga possuem em microrganismos patogénicos é importante devido ao crescente interesse no desenvolvimento de agentes antimicrobianos naturais para a indústria alimentar. A combinação destes compostos com outras barreiras de conservação poderá aumentar a estabilidade microbiológica e consequentemente a segurança dos alimentos (Pandit e Shelef, 1994).

## **2.4. Stress e resposta ao stress dos microrganismos**

O termo “lesão bacteriana” pode ser definido como o efeito que um ou mais tratamentos sub-letais podem exercer sobre o microrganismo, consequentemente resulta da exposição a um processo que lesa mas não mata o microrganismo (Hurst, 1977, 1984; Russel, 1984, citados por Wesche *et al.*, 2009). Do ponto de vista da microbiologia alimentar, o termo “stress” descreve uma condição física, química ou nutricional que, não sendo severa o suficiente para matar o microrganismo, resulta na sua lesão (Hurst, 1977; Murano e Pierson, 1993, citados por Wesche *et al.*, 2009).

O stress é imposto às células de variadas formas, pois o ambiente circundante pode alterar-se em termos de disponibilidade de água, acidez ou alcalinidade, temperatura, presença de agentes antimicrobianos ou ausência de nutrientes, entre outras (Brul *et al.*, 2002; Wesche *et al.*, 2009).

Em condições de stress ligeiro não se verifica a perda de viabilidade, embora se verifique redução da taxa de crescimento ou entrada na fase estacionária. Nestas condições poderá verificar-se uma adaptação transitória, denominada resposta adaptativa, que aumenta a tolerância do microrganismo a esse ou a outro tipo de stress. O stress moderado, para além de provocar uma diminuição da taxa de crescimento, causa também alguma perda da viabilidade celular. Já um stress severo ou extremo é normalmente letal para as células, resultando na morte da maioria da população (Yousef e Courtney, 2003).

As lesões sub-letais metabólica e estrutural manifestam-se pela perda das capacidades de crescimento características e pela incapacidade de formação de colónias sob condições selectivas, sob as quais as células não lesadas são capazes de formar colónias (Busta, 1976; Hurst, 1977, citados por Wesche *et al.*, 2009).

A membrana citoplasmática dos microrganismos é frequentemente considerada o alvo de acção dos biocidas (Maillard, 2002), e a defesa da célula contra ambientes de stress consiste normalmente no fortalecimento da membrana e parede celulares (Brul *et al.*, 2002). De um modo geral bactérias Gram-negativas exibem maior resistência a compostos antimicrobianos que bactérias

Gram-positivas (Bower e Daeschel, 1999; Agatemor, 2009; Akroum *et al.*, 2009; Doughari *et al.*, 2009). A membrana externa das bactérias Gram-negativas, que actua como barreira a substâncias hidrofóbicas e macromoléculas, os ácidos teicoicos das bactérias Gram-positivas, e as bombas com capacidade de extrudir compostos tóxicos são características que contribuem para a resistência dos microrganismos (Bower e Daeschel, 1999; Puupponen-Pimiä *et al.*, 2001, 2005a; Nohynek *et al.*, 2006). Estas bombas de efluxo podem ser activadas como resposta a sinais externos ou por mutação de um gene regulador da sua expressão (Levy, 2002), sendo que a sua existência foi já observada em estirpes de *S. aureus* resistentes a antibióticos (Russell e Day, 1996, citados por Bower e Daeschel, 1999).

Outras respostas ao stress incluem: 1. a síntese de proteínas que reparam os danos, mantêm a homeostasia da célula ou eliminam o agente causador do stress; 2. o aumento transitório da resistência ou tolerância a factores nocivos; 3. passagem a um estado de dormência, como a formação de esporos ou a passagem ao estado “viável não culturável”; e 4. mutações adaptativas (Yousef e Courtney, 2003), como a formação de biofilme (Bower e Daeschel, 1999; Johnson, 2003), a alteração da permeabilidade da membrana, degradação celular dos compostos antimicrobianos e alteração dos seus alvos (Brehm-Stecher e Johnson, 2003), a acumulação de compostos de armazenamento, mudanças na composição do envelope celular e alteração da morfologia geral (Hengge-Aronis, 1999, citado por Yousef e Courtney, 2003), entre outras.

Em situações de exposição a pH baixo, as respostas das bactérias incluem alterações na composição da membrana, aumento do efluxo de protões e aumento do catabolismo de aminoácidos (por cada aminoácido descarboxilado é consumido um protão do citoplasma e libertam-se compostos alcalinos, i.e., amónia), de modo a que o pH citoplasmático se mantenha próximo da neutralidade e que a conformação das proteínas, enzimas, ácidos nucleicos e fosfolípidos se mantenha (Yousef e Courtney, 2003).

Nos alimentos, as bactérias podem estar expostas a níveis elevados de espécies reactivas de oxigénio, como peróxido de hidrogénio, radicais hidroxilo e superóxido (Yousef e Courtney, 2003; Wesche *et al.*, 2009). O denominado

“stress oxidativo” ocorre em situações em que a produção de radicais livres é superior à capacidade de desintoxicação que a célula possui (Farr e Kogoma, 1991; Lushchak, 2001). Estes agentes oxidantes causam dano nas proteínas celulares, lípidos e ácidos nucleicos (Farr e Kogoma, 1991; Yousef e Courtney, 2003; Wesche *et al.*, 2009) e, enquanto muitas das proteínas conhecidas induzidas pelo stress oxidativo possuem uma função antioxidante (glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase), outras (exonucleases e glicosilases) estão envolvidas na reparação do dano oxidativo, especialmente ao nível dos ácidos nucleicos (Yousef e Courtney, 2003; Wesche *et al.*, 2009).

A adaptação dos microrganismos a situações de stress é mediada por alterações na sua fisiologia, incluindo alterações estruturais e metabólicas. Está demonstrado que a exposição a stresses induz um largo espectro de respostas adaptativas, desde pequenas adaptações fisiológicas a mudanças extremas na estrutura celular e populacional (Johnson, 2003). A quantidade de energia disponível é um bom indicador da capacidade adaptativa do microrganismo, pois determina até que ponto a célula é capaz de activar os mecanismos de resposta ao stress, uma vez que as respostas que levam à adaptação são dispendiosas a nível energético e a célula necessita de manter o equilíbrio entre a energia necessária para restaurar a homeostasia e para a manutenção das funções vitais para o crescimento (Brul e Coote, 1999).

A capacidade de resistência ou de adaptação a condições de stress permite o crescimento de microrganismos, quer patogénicos quer responsáveis pela deterioração dos alimentos, tendo implicações na segurança dos alimentos (Beales, 2004).

## **2.5. Heterogeneidade da resposta ao stress**

Quando uma população bacteriana encontra um factor de stress, as células mais susceptíveis morrem, enquanto as que já possuíam alguma resistência ou que a adquiriram posteriormente, podem sobreviver e proliferar (Bower e Daeschel, 1999). Esta heterogeneidade poderá dever-se a uma variabilidade genotípica, através de mutações; e fenotípica, quer devido à progressão ao longo do ciclo celular, quer devido a alterações do ambiente circundante

(Davey e Kell, 1996). A resposta dos microrganismos a condições de stress não é uma situação de “tudo ou nada”, os vários graus de lesão induzidos pela exposição a condições adversas dependem do estado fisiológico das células individuais existentes na população (Wesche *et al.*, 2009), pelo que uma pequena fracção da população poderá ter a capacidade de sobreviver à exposição a um stress que mata a maioria da população (Booth, 2002).

A contagem do número de colónias capazes de crescer em meio sólido, o método padrão para a análise da viabilidade celular, para além de ser uma técnica morosa, indica apenas a quantidade de células capazes de crescer sob determinadas condições de crescimento, podendo subestimar o número de células viáveis, especialmente após dano por tratamentos físicos, pois esta fracção danificada, apesar de ser não culturável poderá manter a actividade metabólica (Ben Amor *et al.*, 2002), além de que poderá permanecer viável e portanto vir a crescer em alimentos processados (Breeuwer e Abee, 2000; Ritz *et al.*, 2001; Ben Amor *et al.*, 2002; Ananta *et al.*, 2004).

Hoje sabe-se que não é possível compreender a fisiologia de uma população bacteriana se esta for tratada como um todo, como se todas as células que a constituem fossem iguais e contribuíssem da mesma forma para o seu desempenho. Ao considerar o estado fisiológico de uma população, este é melhor definido como um “padrão fisiológico”, referente à distribuição de vários estados fisiológicos presentes nessa população (Davey e Kell, 1996). A análise de células individuais, através da citometria de fluxo (CMF), é a melhor, e muitas vezes a única forma de caracterização dessa heterogeneidade (Shapiro, 2000), revelando que os microrganismos não estão apenas vivos ou mortos, mas que existem em vários estados fisiológicos intermédios numa população (Nebe-von-Caron *et al.*, 2000; Davey e Winson, 2003).

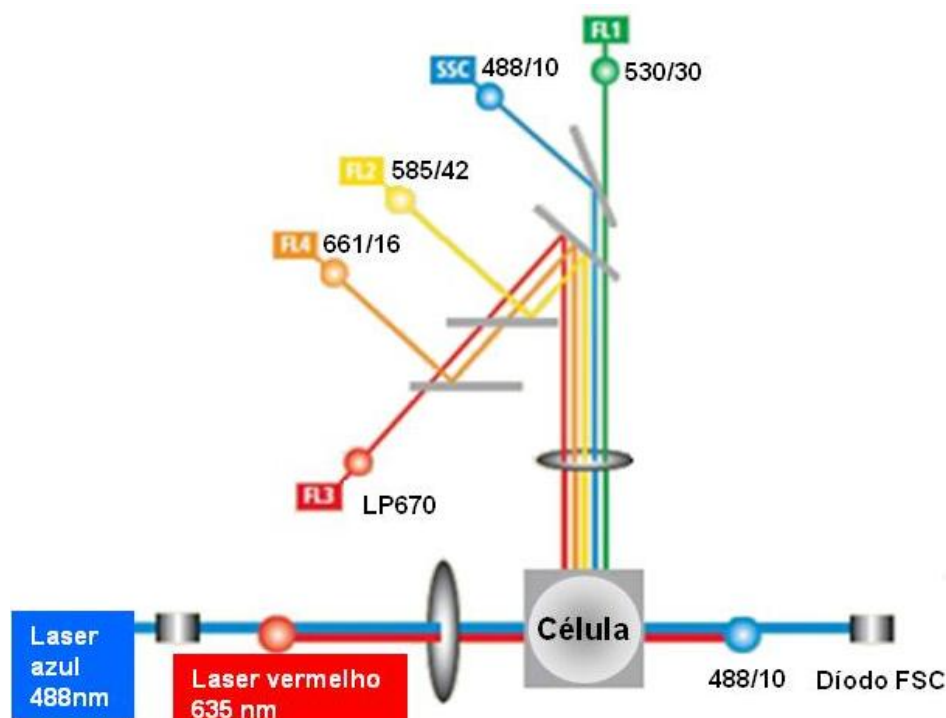
### **2.5.1. Citometria de fluxo**

A CMF é uma técnica que tem sido amplamente utilizada na análise de células eucariotas desde os anos 70 do século passado, embora apenas mais recentemente se tenha passado a utilizar na área da microbiologia (Czechowska *et al.*, 2008). Esta técnica permite a rápida análise das

características físicas e químicas de células, ou partículas celulares, em suspensão, quando estas passam individualmente por um feixe de luz (Davey e Kell, 1996; Álvarez-Barrientos *et al.*, 2000).

Um típico citómetro de fluxo (figura 2.1) é constituído por três componentes principais: o sistema óptico, constituído por uma ou mais fontes de luz, sendo estas normalmente lasers, e por uma série de lentes, filtros e detectores, para a focagem, direccionamento e detecção dos sinais de interesse; o sistema hidráulico, responsável pela produção de um fluxo contínuo que permite a passagem individual das células a uma velocidade constante pelo feixe de luz, num processo denominado focagem hidrodinâmica; e o sistema electrónico, responsável pelo processamento analógico dos sinais produzidos pelos detectores e tornando-os analisáveis pelo *software* utilizado (Álvarez-Barrientos *et al.*, 2000; Comas-Riu e Rius, 2009).

À medida que as células passam pelo feixe de luz são detectados três parâmetros: a dispersão frontal da luz (Forward Scatter Channel – FSC), que fornece informação acerca do tamanho celular, sendo também normalmente utilizada como parâmetro de exclusão de agregados celulares e detritos; a dispersão lateral da luz (Side Scatter Channel – SSC), que fornece informação acerca da estrutura interna da célula, sendo que valores elevados deste parâmetro são obtidos a partir de células que apresentam elevada granularidade citoplasmática; e a fluorescência (Davey e Kell, 1996; Veal *et al.*, 2000; Comas-Riu e Rius, 2009), que pode ser medida em três intervalos de comprimento de onda, o verde, o laranja e o vermelho, direccionados para detectores específicos, FL1, FL2 e FL3, respectivamente (Veal *et al.*, 2000).



**Figura 2.1.** Configuração de um citômetro de fluxo (adaptado de BD Biosciences: [http://www.bdbiosciences.com/documents/facscalibur\\_brochure.pdf](http://www.bdbiosciences.com/documents/facscalibur_brochure.pdf)).

A CMF possui a vantagem de proporcionar a análise de um elevado número de células e parâmetros celulares a uma velocidade elevada (até 1000 células/s) (Davey e Kell, 1996), a capacidade de detecção de microrganismos em concentrações relativamente baixas (Comas-Riu e Rius, 2009), a objectividade dos resultados (Comas-Riu e Rius, 2009), e a capacidade de definir várias sub-populações dentro de uma mesma cultura (Davey e Winson, 2003), entre outras.

Existem diversos estudos que utilizam a técnica da CMF na área da microbiologia, quer na determinação do número de células viáveis (Jepras *et al.*, 1995; Gunasekera *et al.*, 2000; Ben Amor *et al.*, 2002), na avaliação da actividade antimicrobiana de diferentes compostos (Cox *et al.*, 2000; Fitzgerald *et al.*, 2004; Paparella *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2009) e do efeito de diferentes métodos de conservação (Arroyo *et al.*, 1999; Ritz *et al.*, 2001; Ananta *et al.*, 2004; Schenk *et al.*, 2011), como também no estudo da resposta e adaptação ao stress de células de *Oenococcus oeni* (da Silveira *et al.*, 2002, 2009), entre outros.

### 2.5.2. Fluorocromos

Apesar de ser possível a medição de vários parâmetros usando apenas os dados obtidos a partir da dispersão da luz, é a capacidade de utilizar partículas com fluorescência associada que torna esta técnica especialmente útil (Davey e Kell, 1996). A medição da heterogeneidade da intensidade de fluorescência das células presentes numa população apresenta uma vantagem relativamente às medições como um todo, que não permitem este tipo de avaliação (Davey e Kell, 1996).

Marcadores que permitem avaliar diferentes funções celulares têm sido utilizados para avaliar a heterogeneidade fisiológica bacteriana em diferentes condições de stress. No entanto, os espectros de excitação/emissão de muitos deles são comuns, impedindo a marcação simultânea das amostras e a colheita dos vários parâmetros de uma determinada célula, pelo que deverão ser escolhidos marcadores cujos espectros permitam a discriminação de um marcador na presença do outro (Joux e Lebaron, 2000).

A capacidade das células se reproduzirem requer tanto a integridade da membrana como actividade metabólica (Nebe-von-Caron *et al.*, 2000). Em ocasiões em que não é possível a medição do crescimento do microrganismo, a detecção de actividade metabólica fornece a prova presumível de crescimento reprodutivo, uma vez que a existência de metabolismo, mesmo na ausência de crescimento, poderá produzir efeitos indesejáveis nos alimentos. Nestas circunstâncias, a utilização de marcadores fluorescentes específicos para a determinação da actividade metabólica e da integridade da membrana permite a diferenciação de estados muito além da definição clássica de viabilidade (Nebe-von-Caron *et al.*, 2000).

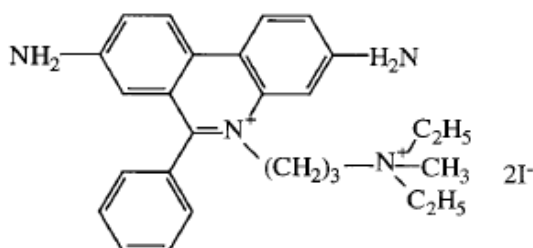
O uso de marcadores fluorescentes ou de substratos fluorogénicos, isolada ou simultaneamente, em combinação com a CMF, permite a detecção e discriminação entre organismos viáveis e culturáveis, viáveis não culturáveis, e não viáveis (Davey e Kell, 1996; Gunasekera *et al.*, 2000; Nebe-von-Caron *et al.*, 2000), assim como a avaliação simultânea de várias componentes e funções celulares, para além do tamanho e complexidade (Davey e Kell, 1996;



Nebe-von-Caron *et al.*, 2000). Esta versatilidade designa-se por análise multiparamétrica. Na revisão efectuada por Shapiro (2000) estão referidos alguns dos parâmetros passíveis de análise por esta técnica, assim como os métodos de medição e os marcadores utilizados.

A caracterização dos microrganismos como viáveis ou não viáveis, a nível individual, é essencial para a determinação do efeito de agentes antimicrobianos. Alguns dos critérios sugeridos para a viabilidade celular são a impermeabilidade da membrana a fluorocromos como o iodeto de propídio (IP), e a presença de actividade metabólica, indicada pela produção e retenção de um produto fluorescente a partir de um substrato enzimático não fluorescente, como a carboxifluoresceína diacetato (cFDA), ou pela manutenção do potencial de membrana (Shapiro, 2000).

O IP (3,8-diamino-5-diethylmethylamino-propyl-6-phenylphenanthridium diiodide) (figura 2.2) pertence a um conjunto de fluorocromos específicos para os ácidos nucleicos, possuindo duas cargas negativas e um espectro de excitação/emissão de fluorescência de 488 nm e >635 nm, respectivamente (Davey e Kell, 1996; Shapiro, 2000). Este fluorocromo possui a capacidade de ligação tanto ao ADN como ao ARN por intercalar a estrutura de dupla hélice, (Davey e Kell, 1996; Álvarez-Barrientos *et al.*, 2000; Shapiro, 2000). Este processo de intercalação resulta num aumento considerável da fluorescência, comparativamente com o fluorocromo livre (Davey e Kell, 1996; Shapiro, 2000).



**Figura 2.2.** Estrutura química do fluorocromo IP (Davey e Kell, 1996).

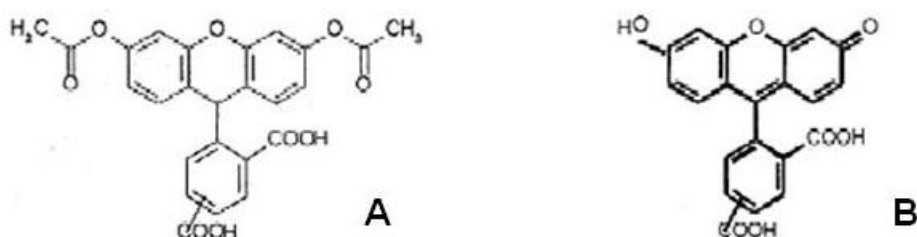
O IP é um fluorocromo impermeável à membrana, pelo que células que o incorporam são normalmente consideradas como não viáveis (Davey e Kell, 1996; Álvarez-Barrientos *et al.*, 2000; Nebe-von-Caron *et al.*, 2000; Shapiro, 2000; Veal *et al.*, 2000; Comas-Riu e Rius, 2009), embora uma permeabilidade

transitória a este tipo de marcadores possa ser induzida por certos tratamentos, com consequente recuperação da integridade da membrana e viabilidade (Shapiro, 2000).

Para além da determinação da viabilidade por exclusão, como no caso do IP, pode utilizar-se um substrato não fluorescente e permeável à membrana que, uma vez no meio intracelular é clivado enzimaticamente, formando um produto fluorescente e impermeável. Este produto é retido nas células que possuem membranas intactas e actividade esterásica, sendo rapidamente difundido das células que possuem membranas danificadas (Breeuwer e Abee, 2000; Joux e Lebaron, 2000; Shapiro, 2000; da Silveira *et al.*, 2002; Comas-Riu e Rius, 2009).

Um exemplo de um substrato lipofílico não fluorescente é a cFDA (figura 2.3A) (espectro de excitação/emissão de fluorescência de 488 nm e 517 nm, respectivamente), que é convertida em carboxifluoresceína (cF) (figura 2.3B) por enzimas citoplasmáticas funcionais, as esterases (Bunthof *et al.*, 2001). A cF dissocia-se a pH fisiológico, ficando carregada negativamente, impedindo a sua difusão para o exterior da célula (Breeuwer e Abee, 2000). A demonstração da actividade de enzimas, como as esterases, fornece indicações acerca da actividade metabólica, demonstrando que uma célula foi capaz de as sintetizar e mantê-las na forma activa (Breeuwer e Abee, 2000).

No entanto, estes compostos podem ser extrudidos por sistemas de efluxo existentes nas células viáveis, eles próprios indicadores de metabolismo celular funcional, podendo resultar em interpretações erradas acerca da viabilidade de células com pouca ou nenhuma fluorescência (Davey e Kell, 1996; Bunthof *et al.*, 2000; Breeuwer e Abee, 2000; Nebe-von-Caron *et al.*, 2000).



**Figura 2.3.** Estrutura química do substrato não fluorescente cFDA (A) e do composto fluorescente cF resultante da sua esterificação (B) (Bunthof *et al.*, 2000).

A análise de células desenergizadas, de modo a excluir a interferência da actividade metabólica, permite a avaliação da integridade da membrana por retenção (cF) e exclusão (IP) de marcadores fluorescentes. Do mesmo modo, após energização das células, é possível a determinação da capacidade de extrusão de cF, e consequente avaliação da sua actividade metabólica (Bunthof *et al.*, 1999; da Silveira *et al.*, 2002)

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Caracterização das amostras

As bagas maduras de *Vaccinium cylindraceum* (figura 3.1), em estado selvagem, foram colhidas no final do mês de Setembro de 2010, em dois locais da ilha Terceira: Furnas do Enxofre e Algar do Carvão. Após exclusão das bagas ainda verdes e das que apresentavam sinais de infecção, as bagas foram armazenadas a -80 °C até à preparação do extracto.



**Figura 3.1.** *Vaccinium cylindraceum*. Exemplo de um arbusto (A) e pormenor das bagas (B).

#### 3.2. Preparação dos extractos

As bagas congeladas foram trituradas num moinho MM 200 (Retsch, Europa) (figura 3.2), com a ajuda de esferas de aço inox com 1 cm de diâmetro, a 30 Hz, durante 45 segundos, e diluídas em água destilada a 4 °C (solvente polar) na proporção de 1:1 (peso:volume). Utilizaram-se tanto bagas colhidas nas Furnas do Enxofre como no Algar do Carvão. Ambos os extractos foram homogeneizados e posteriormente centrifugados (10 minutos, a 13000 rpm, 4 °C) de modo a retirar o material suspenso, e os sobrenadantes foram esterilizados por filtração com um filtro de 0,2 µm (Sartorius stedim Biotech, Alemanha). Os extractos filtrados, com um pH de 2,92 (Furnas do Enxofre) e de 2,75 (Algar do Carvão), foram armazenados a - 80 °C até à sua utilização.



**Figura 3.2.** Moinho utilizado para triturar as bagas congeladas.

### **3.3. Estirpes bacterianas**

Utilizou-se a cultura *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (Microbiologick, MediMark Europe, França), que foi reactivada segundo as instruções do fabricante e mantida a -80 °C em água peptonada com 30% de glicerol. O pré-inóculo foi cultivado a 2%, em Caldo Nutritivo (CN) (AES Laboratoire, França), suplementado com glucose (5 g/L), e crescido *overnight* a 37 °C, após o que se re-inoculou novamente a 2% e cresceu-se 4 horas a 37 °C. O inóculo assim obtido foi utilizado para obter as culturas crescidas em diferentes condições.

### **3.4. Actividade antimicrobiana**

A actividade antibacteriana do extracto de *V. cylindraceum* foi avaliada através do efeito na taxa de crescimento de *S. aureus* crescido na presença de extracto. Diluiu-se 50 vezes a cultura de inóculo em meio fresco sem adição de extracto e na presença de concentrações crescentes de extracto (0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 mg/ml), num volume final de 15 ml. A monitorização do crescimento a 37 °C foi feita através da medição da absorvância a 595 nm num espectrofluorímetro (Infinite F200 Pro, Tecan, Áustria), numa placa de 24 poços (Greiner bio-one, Alemanha). Fizeram-se leituras em intervalos de tempo regulares durante 24 horas. Cada ensaio foi repetido em quadruplicado. As taxas de crescimento foram calculadas a partir dos valores da OD<sub>595nm</sub> logaritmizados. A concentração mínima inibitória foi definida como a

concentração mais baixa de extracto que inibiu o crescimento de *S. aureus* num período de 24 horas.

### **3.5. Adaptação e stress**

Diluiu-se a cultura de inóculo 50 vezes em meio fresco sem adição de extracto e na presença de 60 mg/ml de extracto de bagas de *V. cylindraceum* colhidas nas Furnas do Enxofre e incubou-se a 37 °C até atingir o meio da fase exponencial ( $OD_{595nm}=0,5$ ), o que correspondeu a 4 horas e 10 horas, na ausência e na presença de extracto, respectivamente. As células foram colhidas por centrifugação, durante 10 minutos, a 4000 rpm, a temperatura ambiente (TA), e concentradas para uma  $OD_{595nm}$  de 5 em meio fresco adicionado de extracto de bagas de *V. cylindraceum* das Furnas do Enxofre ou do Algar do Carvão, na concentração de 160 mg/ml, durante uma hora, a 37 °C.

### **3.6. Contagem de colónias**

Avaliou-se a viabilidade das células de *S. aureus* por crescimento em placa nas mesmas condições em que foram adaptadas, stressadas e analisadas por CMF. Retiraram-se amostras de cada uma das culturas em intervalos de tempo regulares, foram feitas diluições seriadas em tampão Fosfato de Sódio (NaPi) 50 mM (pH 7,4), sendo 100 µl da diluição adequada plaqueada em CN com 1,3% de agar (AES Laboratoire, França), em triplicado. Após 24h de incubação a 37 °C, procedeu-se à contagem das unidades formadoras de colónias/ml (ufc/ml), e os resultados expressos como  $\log_{10}$  ufc/ml.

### **3.7. Preparação das suspensões celulares**

Os *pellets* das células dos diferentes tratamentos (controlo, adaptadas, stressadas e adaptadas stressadas), foram lavadas três vezes em tampão NaPi 50 mM (pH 7,4), esterilizado por filtração (filtro de 0,2 µm), e ressuspendidas no mesmo volume de tampão. Após as lavagens, as células foram desenergizadas com 2-Deoxy-D-glucose (Sigma-Aldrich, Alemanha), um análogo da glucose não metabolizável cuja fosforilação resulta na diminuição

da concentração intracelular de ATP, numa concentração final de 1 mM, durante 30 minutos a TA, após o que foram recolhidas por centrifugação a TA durante 5 minutos a 10000 rpm, lavadas em tampão NaPi 50 mM (pH 7,4) e ressuspendidas no mesmo tampão para uma OD<sub>595</sub> de 5.

### **3.8. Marcação das células com carboxifluoresceína diacetato (cFDA)**

A marcação das células foi adaptada da metodologia descrita por da Silveira *et al.* (2002), com algumas modificações. Preparou-se uma solução *stock* de 5 mM de cFDA (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon) em acetona, que foi armazenada a -20 °C no escuro. A cFDA foi adicionada à suspensão celular (OD<sub>595nm</sub>=5) a uma concentração de 50 µM e incubada a 37 °C durante 30 minutos (ou 45 minutos para as células crescidas na presença de extracto), de modo a permitir a conversão enzimática intracelular da cFDA em carboxifluoresceína (cF).

### **3.9. Marcação com iodeto de propídio (IP)**

O IP, uma molécula carregada negativamente, foi utilizado para marcar células com a membrana comprometida, segundo a metodologia descrita por Comas e Vives-Rego (1998), com algumas modificações. As suspensões celulares (OD<sub>595nm</sub>=5) foram diluídas 1000 vezes em tampão NaPi 50 mM (pH 7,4) e o IP (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon) foi adicionado numa concentração final de 10 µg/ml (a partir de uma solução *stock* de 1 mg/ml, em água). As células foram incubadas a 37 °C, durante 10 minutos. Como controlo positivo, marcaram-se células previamente mortas a 100°C durante 10 minutos. Para os ensaios de dupla marcação, as suspensões celulares foram marcadas simultaneamente com cFDA e IP, nas concentrações anteriormente descritas, e incubadas a 37°C durante 30 minutos (ou 45 minutos para as células crescidas na presença de extracto).

### 3.10. Avaliação do efluxo de cF

As células, previamente marcadas com cF ( $OD_{595nm}=5$ ), foram diluídas 100 vezes em tampão NaPi 50 mM (pH 7,4) e incubadas a 37 °C na presença de uma fonte de energia metabolizável. No tempo zero adicionou-se glucose na concentração final de 5 g/l e retiraram-se amostras (100 µl) ao longo do tempo durante 30 minutos, que foram diluídas em tampão NaPi 50 mM (pH 7,4) para um volume final de 1 ml, e imediatamente analisadas.

### 3.11. Análise por CMF

Utilizou-se um citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) para avaliar a dispersão de luz de células individuais e para medir a fluorescência das mesmas. As amostras foram iluminadas com um laser Argon-ion de 488 nm e a fluorescência emitida pela cF foi detectada a 530 nm (FL1), e a >650 nm a emitida pelo IP (FL3). As análises foram feitas em triplicado, sendo adquiridos eventos correspondentes a 10000 células de *S. aureus* e processados através do programa CELLQuest Pro (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA). A amplificação dos fotomultiplicadores foi feita em modo logarítmico tanto para as dispersões frontal (FSC) e lateral (SSC), como para os canais de fluorescência. Utilizou-se a combinação de FSC e SSC para descriminar a população de bactérias do *background*. Apenas os eventos com valores de FSC superiores a 210 (controlo) ou 180 (adaptadas) e valores de SSC superiores a 199 (ambas as condições de tratamento) foram considerados para análise. Os dados foram analisados com o programa WinMDI (versão 2.9: <http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/software/Winmdi.htm>).



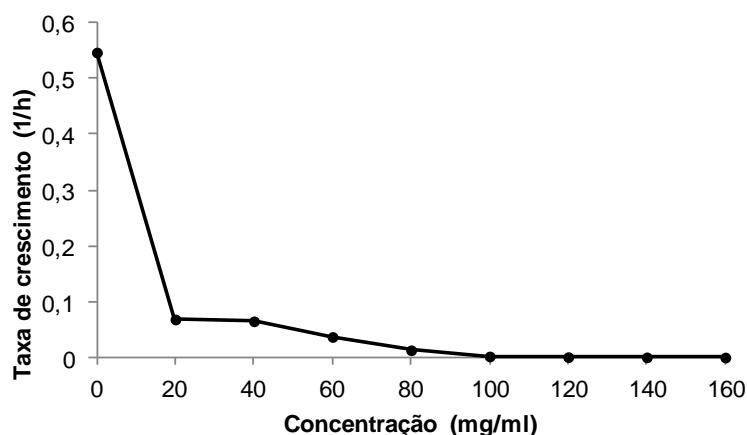
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Actividade antimicrobiana

Neste estudo foram utilizadas bagas congeladas devido ao facto de o seu período óptimo de colheita ser relativamente curto (entre Setembro e Outubro). Relativamente à actividade de bagas congeladas, Nohynek *et al.* (2006) verificaram que, após o período de 1 ano, embora a quantidade de compostos fenólicos diminuísse, a actividade antimicrobiana destes não era influenciada.

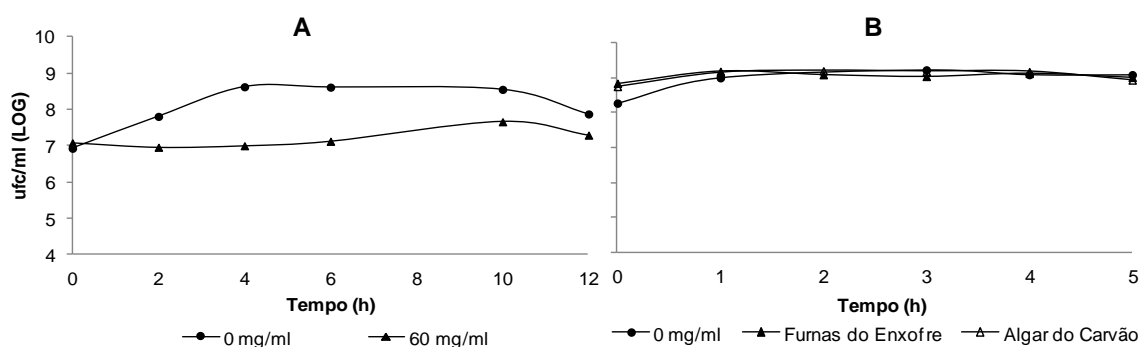
A actividade antimicrobiana do extracto de *Vaccinium cylindraceum* em relação a *Staphylococcus aureus* foi analisada através do seu efeito na taxa de crescimento, tendo-se verificado que o *S. aureus* é susceptível ao extracto de *V. cylindraceum* (figura 4.1), apresentando uma diminuição da taxa de crescimento de aproximadamente 6 vezes, com apenas 20 mg/ml de extracto.

Com base nestes resultados escolheram-se as concentrações de extracto a utilizar para stressar e adaptar as células de *S. aureus*. Inicialmente tentou-se crescer as células na presença de 80 mg/ml de extracto, no entanto, para esta concentração não se conseguiu obter a quantidade de células necessária à realização dos ensaios, assim, optou-se por crescer as células na presença de 60 mg/ml de extracto. Para sujeitar as células a uma situação de stress optou-se por utilizar uma concentração de 160 mg/ml de extracto de *V. cylindraceum*, por ser o dobro da concentração anterior à concentração em que deixa de haver crescimento, neste caso 80 mg/ml.



**Figura 4.1.** Efeito das várias concentrações de extracto aquoso de *V. cylindraceum* na taxa de crescimento de *S.aureus*, determinado a partir da leitura da OD<sub>595</sub>.

De forma a garantir que as células de *S. aureus* mantinham a viabilidade durante o crescimento na presença de extracto de bagas de *V. cylindraceum*, recolheram-se amostras ao longo do tempo de crescimento em meio líquido, na ausência e na presença de 60 mg/ml de extracto e plaqueou-se em Caldo Nutritivo (CN) com 1,3% de agar, verificando-se que a partir da hora 10 a cultura de *S. aureus* começou a perder viabilidade (figura 4.2A), pelo que se determinou as 10 horas como o tempo para o crescimento na presença de extracto. A questão da manutenção da viabilidade das células tornou-se ainda mais pertinente quando estas foram sujeitas a 160 mg/ml de extracto, no entanto, verificou-se que para ambos os extractos, de bagas provenientes das Furnas do Enxofre e do Algar do Carvão, as células mantiveram-se viáveis durante 5 horas (figura 4.2B). Nos tratamentos subsequentes as células foram expostas a 160 mg/ml durante apenas 1 hora, para haver tempo das células responderem ao tratamento, mas sem que elas se consigam adaptar.



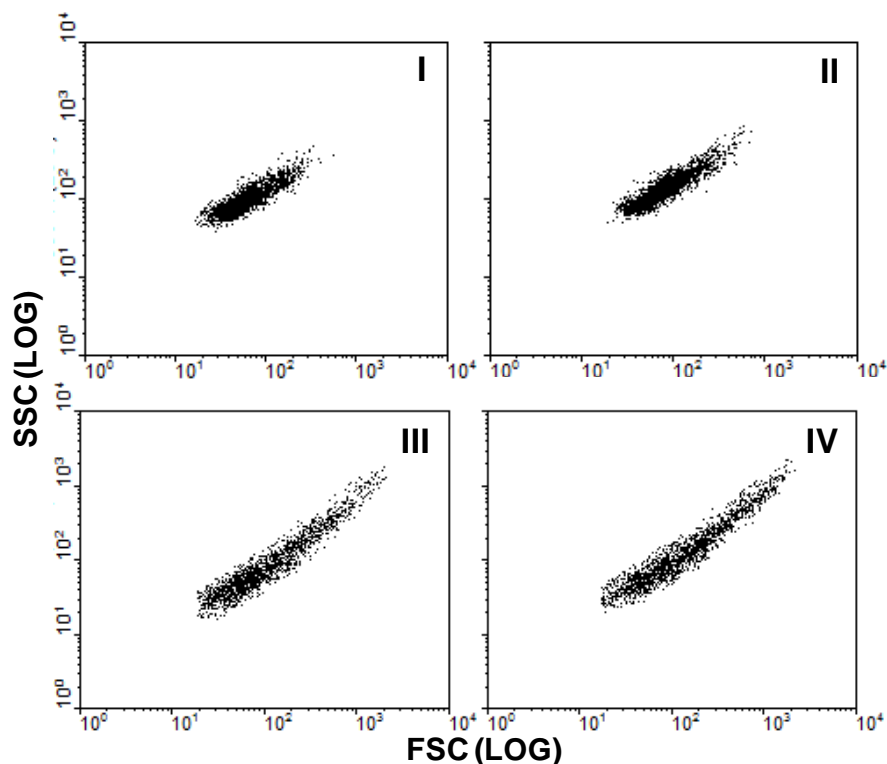
**Figura 4.2.** Efeito do extracto de *V. cylindraceum* na viabilidade celular avaliada através da contagem do número de ufc/ml na condição de crescimento na presença de 60 mg/ml de extracto (A) e aplicação de 160 mg/ml de extracto (B).

Na ausência de extracto, a cultura apresentava um valor de pH de 7, que diminuiu para 4,26 e 4,6 após adição do extracto aquoso de bagas provenientes das Furnas do Enxofre e do Algar do Carvão, respectivamente, e para 4,17 e 4,1 após 1 hora de tratamento com os respectivos extractos. No caso da cultura crescida na presença de extracto de bagas provenientes das Furnas do Enxofre, na ausência de extracto, esta apresentava um valor de pH de 7, que diminuiu para 5,16 após adição do extracto e subiu para 5,29 após 10 horas de crescimento.

## 4.2. Definição das populações

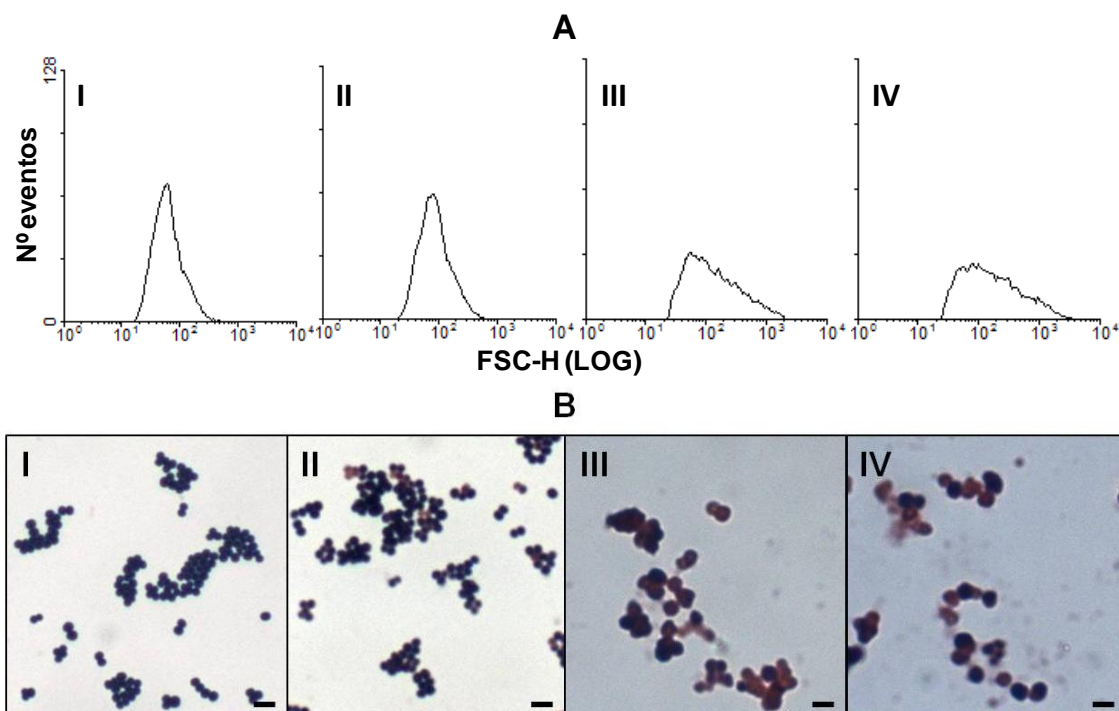
Como descrito na secção Materiais e Métodos, a combinação dos parâmetros dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) foi utilizada para a discriminação entre a população em estudo e o *background* existente na análise por citometria de fluxo (CMF). A figura 4.3 representa os parâmetros FSC e SSC das diferentes populações após crescimento na ausência (figura 4.3 I) e na presença de 60 mg/ml de extracto durante 10 horas (figura 4.3 III) e populações de *S. aureus* que foram stressadas com 160 mg/ml de extracto de bagas provenientes das Furnas do Enxofre durante 1 hora (figura 4.3 II e IV). Como se torna evidente pela análise multiparamétrica dos *dotplot*, as células de *S. aureus* crescidas na presença de 60 mg/ml de extracto eram muito maiores, havendo mesmo parte da população na quarta década logarítmica (figura 4.3 III e IV).

A análise dos histogramas onde se encontram representados os eventos referentes ao FSC e, conseqüentemente, ao tamanho das células de *S. aureus*, torna evidente que a população de células crescidas na presença de extracto é muito mais heterogénea, como se pode verificar pela dispersão no histograma (figura 4.4A, III), do que a população de células crescidas sem extracto (figura 4.4A, I). A observação microscópica das células após coloração Gram, revelou que o crescimento na presença de extracto resultou em células muito maiores que as controlo (figura 4.4B, III e I, respectivamente).



**Figura 4.3.** Dotplots FSC vs SSC da cultura de *S. aureus* crescida na ausência de extracto (I) e posteriormente sujeita à acção de 160 mg/ml de extracto durante 1h (II) e crescida na presença de 60 mg/ml de extracto (III) e posteriormente sujeita à acção de 160 mg/ml de extracto durante 1h (IV).

O tratamento de stress não alterou a população de *S. aureus* em termos de análise multiparamétrica (figura 4.3 II e IV). Surpreendentemente, as preparações destas células que estiveram em contacto com o extracto de bagas durante o stress (figura 4.4B, II) revelaram que algumas células perderam o cristal de violeta corando de vermelho claro, tendo-se observado o mesmo fenómeno nas preparações de células que estiveram em contacto com o extracto durante o crescimento (figura 4.4B, III).



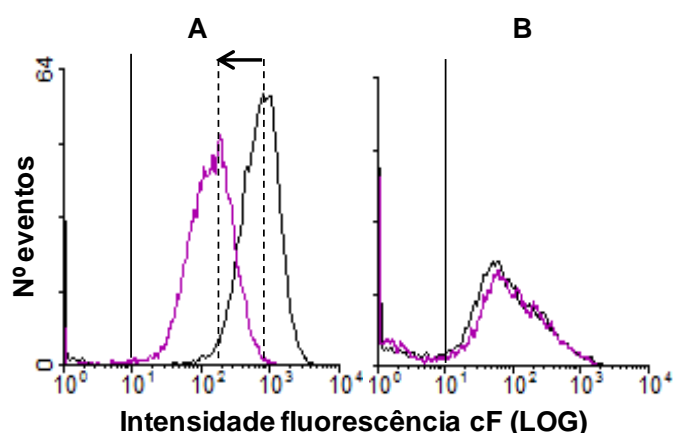
**Figura 4.4.** Análise do tamanho das células avaliada por histogramas de células de *S. aureus* obtidos por CMF (A) e pela coloração Gram (B), relativamente às células crescidas na ausência de extracto (I) e sujeitas à acção de 160 mg/ml de extracto durante 1h (II), e células crescidas na presença de 60 mg/ml de extracto (III) e sujeitas à acção de 160 mg/ml de extracto durante 1h (IV) (Barra de escala= 2 µm).

### 4.3. Caracterização do estado fisiológico

Uma vez que os marcadores fluorescentes podem ser extrudidos por sistemas de efluxo existentes nas células viáveis, as suspensões de células de *S. aureus* foram desenergizadas de forma a garantir que não haveria extrusão da carboxifluoresceína (cF) por transporte activo. A capacidade das células reterem a cF indica não só a presença de actividade enzimática, como também integridade da membrana. Assim, as células que se encontram cF fluorescentes são consideradas saudáveis. A figura 4.5 mostra a distribuição da fluorescência verde (FL1) da população de *S. aureus* crescida na ausência de extracto (A) e na presença de 60 mg/ml de extracto durante 10 horas (B), e posteriormente stressadas com 160 mg/ml de extracto durante 1 hora.

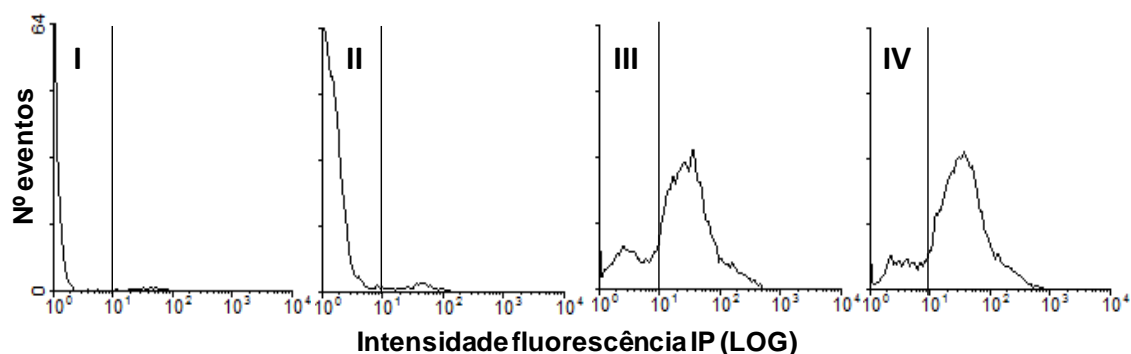
Comparando a população de *S. aureus* controlo com a que foi stressada (figura 4.5A), é possível verificar que a intensidade de fluorescência e o número de células marcadas com cF é menor na população que foi stressada, indicado pelo desvio do pico para a esquerda e pela diminuição da sua altura, o que

sugere uma diminuição da actividade das esterases nestas células. No entanto, essas diferenças não se verificam na população crescida na presença de extracto (figura 4.5B), indicando uma possível pré-adaptação ao extracto.



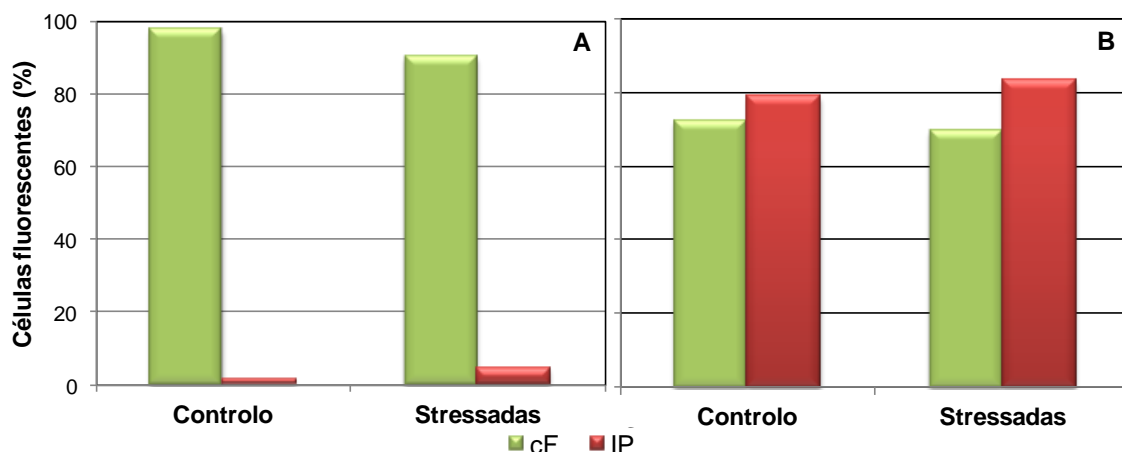
**Figura 4.5.** Histogramas de células de *S. aureus* crescidas na ausência de extracto (A) e na presença de 60 mg/ml de extracto durante 10h (B) e marcadas com cF. As células foram recolhidas por centrifugação, lavadas com tampão NaPi 50 mM (pH 7,4) e posteriormente stressadas com 160 mg/ml de extracto durante 1h (linha roxa). (Linha sólida divide células consideradas não marcadas e marcadas).

O iodeto de propídio (IP) é normalmente utilizado como um marcador de morte por ser excluído das células com membrana celular intacta; por conseguinte, a fluorescência emitida por este fluorocromo é geralmente associada a células que perderam a sua integridade de membrana (Ben Amor *et al.*, 2002). A exposição das células de *S. aureus* a 160 mg/ml de extracto durante 1 hora resultou num ligeiro aumento do número de células que ficaram marcadas com IP (figura 4.6 I e II), entre a primeira e segunda décadas logarítmicas, no entanto, o crescimento das células na presença de 60 mg/ml de extracto resultou no aparecimento de duas sub-populações (figura 4.6 III), uma das quais com a membrana comprometida (IP fluorescente). Novamente, as células que foram crescidas na presença de extracto não apresentaram diferenças significativas após o stress (figura 4.6 IV).



**Figura 4.6.** Histogramas de células de *S. aureus* crescidas na ausência de extracto (I) e na presença de 60 mg/ml de extracto durante 10h (III) e marcadas com IP. As células foram recolhidas por centrifugação, lavadas com tampão NaPi 50 mM (pH 7,4) e posteriormente stressadas com 160 mg/ml de extracto durante 1h (II e IV). (Linha sólida divide células consideradas não marcadas e marcadas).

A figura 4.7 mostra a percentagem de células fluorescentes após marcação com cF e IP isoladamente. Nas células crescidas na ausência de extracto e posteriormente tratadas com 160 mg/ml de extracto durante 1 hora (figura 4.7A), a percentagem de células marcadas com cF diminuiu cerca de 7% (de 97,6% para 90,1%), enquanto a percentagem de células marcadas com IP aumentou cerca de 3% (de 1,3% para 4,6%). Nas células crescidas na presença de extracto (figura 4.7B), a percentagem de células marcadas com IP foi de 78,93% e de 72,16% as marcadas com cF, ou seja, embora se tenha observado um grande aumento na marcação com IP, a percentagem de células marcadas com cF permaneceu elevada (anexo I, quadro 1). Estes resultados sugerem que parte da população se encontrava marcada com ambas as moléculas fluorescentes, provavelmente como resultado de uma permeabilização temporária da membrana, resultando num influxo transitório de IP.

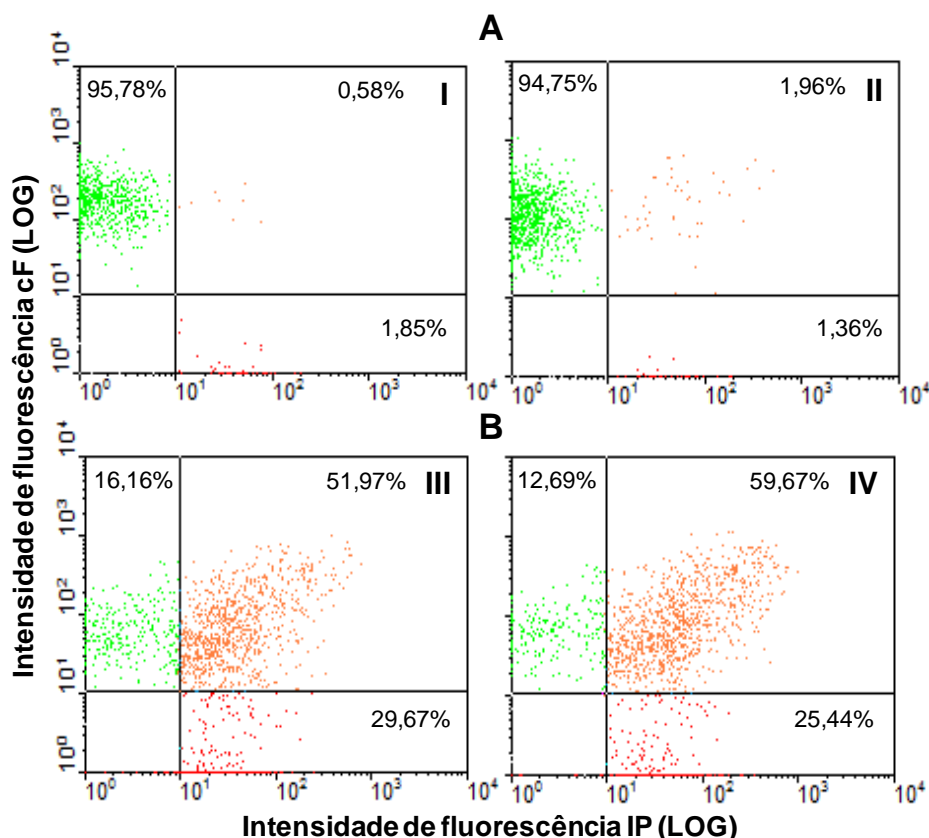


**Figura 4.7.** Efeito do extracto aquoso de *V. cylindraceum* em células de *S. aureus* avaliado pela retenção de cF e exclusão de IP. As células foram crescidas na ausência (A) e na presença de 60 mg/ml de extracto (B), recolhidas por centrifugação, lavadas com tampão NaPi 50 mM (pH 7,4) e stressadas com 160 mg/ml de extracto durante 1h.

Neste sentido, procedeu-se à marcação simultânea das células de *S. aureus* com cF e IP, tendo-se verificado a existência de três sub-populações, baseadas nas suas características de fluorescência, correspondentes a diferentes estados fisiológicos (figura 4.8). Estas sub-populações consistiram em células marcadas apenas com cF (quadrante superior esquerdo; cF<sup>+</sup> IP<sup>-</sup>), correspondendo a células saudáveis, células marcadas apenas com IP (quadrante inferior direito; cF<sup>-</sup> IP<sup>+</sup>), correspondendo a células com membrana danificada, e células duplamente marcadas (quadrante superior direito; cF<sup>+</sup> IP<sup>+</sup>), correspondendo a células com esterases activas e membrana permeável (Ananta *et al.*, 2004).

A análise multiparamétrica das células crescidas na presença de extracto revelou uma sub-população correspondente a um estado transitório de células duplamente marcadas, que representava praticamente metade da população (51,97%) (figura 4.8B, III). Esta sub-população foi ainda maior quando as células de *S. aureus* foram sujeitas a 160 mg/ml de extracto durante 1 hora (59,67%) (figura 4.8B, IV).



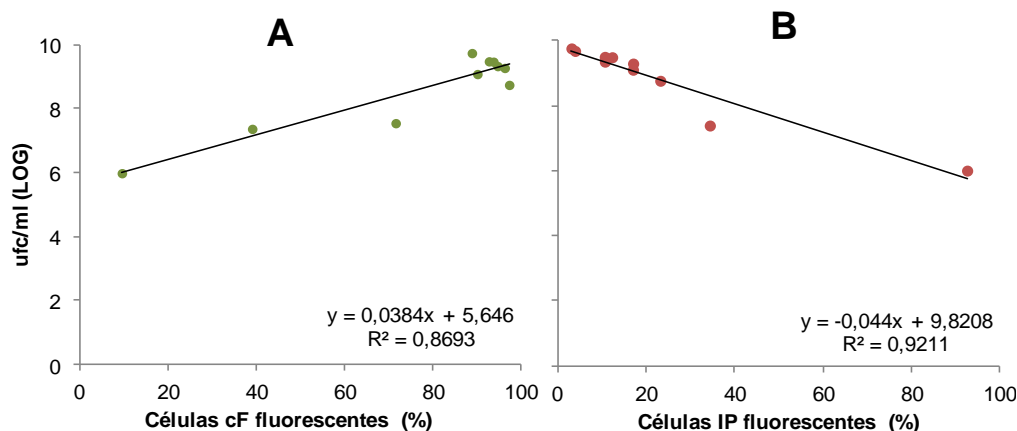


**Figura 4.8.** Efeito do extracto aquoso de *V. cylindraceum* em células de *S. aureus* avaliado pela dupla marcação com cF e IP de células crescidas na ausência (A) e na presença (B) de extracto. Marcações da cultura controlo (I), posteriormente stressada com 160 mg/ml de extracto durante 1h (II); e da cultura crescida na presença de 60 mg/ml de extracto durante 10h (III) e posteriormente stressada com 160 mg/ml de extracto durante 1h (IV).

#### 4.4. Comparação entre contagens por CMF e contagens em placa

De forma a validar os resultados obtidos pela análise por CMF, compararam-se os diferentes estados fisiológicos avaliados pela marcação com fluorescência e a viabilidade das células de *S. aureus* quando expostas a concentrações crescentes de extracto. Retiraram-se amostras às horas 0, 1, 3, 5 e 18, tendo sido avaliada a viabilidade por espalhamento à superfície e a capacidade das células reterem cF e excluírem IP, nas mesmas condições. Verificou-se que os resultados obtidos pela análise por CMF se correlacionaram com as contagens em placa (figura 4.9), sendo a percentagem de células cF<sup>+</sup> directamente proporcional ao número de ufc/ml com um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,87 (figura 4.9A). Em relação à marcação com IP, a relação foi inversa pois as células viáveis, e consequentemente com membrana intacta, excluem o IP,

tendo-se verificado um  $R^2$  de 0,92 entre a percentagem de células  $IP^+$  e o número de ufc/ml (figura 4.9B).



**Figura 4.9.** Comparação entre viabilidade avaliada por ufc e as contagens por CMF de células de *S. aureus* marcadas com cF (A) e IP (B).

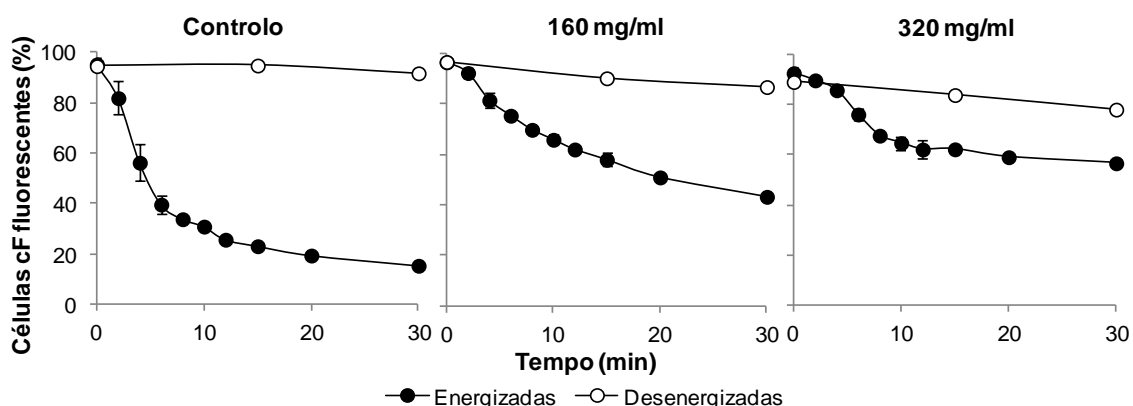
Apesar da correlação existente entre as células  $cF^+$  e  $IP^+$  e o número de ufc/ml contadas em placa, ao longo das primeiras 5 horas de contacto com 320 mg/ml de extracto aquoso de *V. cylindraceum*, verificou-se que os valores das células marcadas com cF analisadas por CMF sobrestimaram a viabilidade celular comparativamente com os dados obtidos pelas contagens em placa, pois a percentagem de células  $cF^+$  manteve-se constante ao longo do tempo enquanto a viabilidade avaliada por ufc diminuiu (anexo I, quadro 2; anexo II, quadro 3, figura 1).

#### 4.5. Avaliação da actividade metabólica

A capacidade das células extrudirem a cF acumulada através de sistemas de transporte activo pode ser considerada um indicador adicional de actividade metabólica (Molenaar *et al.*, 1992; Bunthof *et al.*, 2000), muito em particular da capacidade das células sintetizarem ATP (da Silveira e Abee, 2009). Assim, utilizou-se a CMF para avaliar o efeito do extracto aquoso de *V. cylindraceum* na bioenergética das células individuais de *S. aureus*, através da medição da capacidade de extrusão de cF em células que foram sujeitas a extracto durante 1 hora. Verificou-se que as células controlo, ou seja, não sujeitas ao tratamento com o extracto, foram capazes de reter eficientemente a cF quando não

energizadas (figura 4.10), no entanto, após adição de glucose como fonte de energia, as células de *S. aureus* extrudiram a cF, ao fim de 6 minutos 50% das células já tinham perdido a fluorescência. Ao fim de 30 minutos 15,29% não tinham extrudido a cF acumulada.

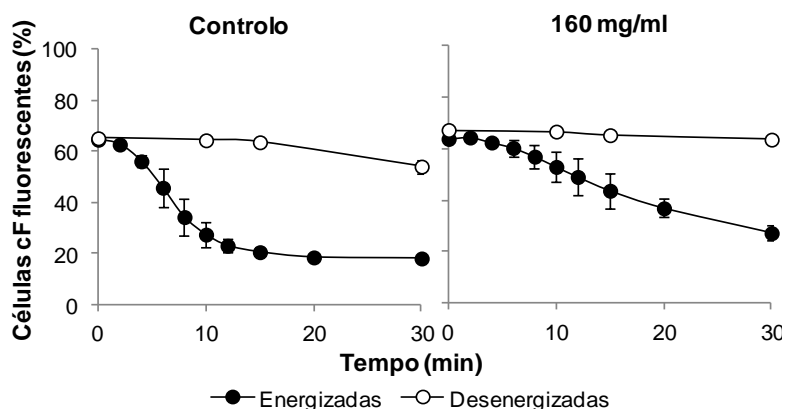
Nas células stressadas (160 mg/ml e 320 mg/ml de extracto) verificou-se um decréscimo na percentagem de células capazes de reter a cF (9,93% e 11,02%, respectivamente), quando mantidas em tampão sem glucose, indicando uma permeabilização da membrana (figura 4.10). Após energização com glucose, as células tratadas com 160 mg/ml de extracto foram menos eficientes a extrudir a cF, verificando-se que apenas 53,4% da população perdeu a fluorescência, a qual foi ainda menor (36%) quando as células foram tratadas com 320 mg/ml de extracto (anexo III, quadro 4 e 5).



**Figura 4.10.** Análise por CMF do efluxo de cF em células de *S.aureus* marcadas por incubação com 50  $\mu$ M cFDA. O efluxo de cF foi medido em suspensão de células (em tampão NaPi, 50 mM, pH 7,4) energizadas com glucose (símbolos preenchidos) e desenergizadas (símbolos não preenchidos), em células não stressadas (controlo), e células stressadas com 160 mg/ml e 320 mg/ml de extracto aquoso durante 1h.

O crescimento das células de *S. aureus* na presença de 60 mg/ml de extracto resultou numa sub-população danificada que não conseguiu marcar com cF, como verificado anteriormente, pelo que no início do ensaio apenas 64,56% da população se encontrava fluorescente (figura 4.11). Quando não energizadas, 11,06% das células perderam cF por difusão passiva, no entanto, e ao contrário do que seria de esperar, nas células stressadas com 160 mg/ml de extracto durante 1 hora apenas 3,7% das células perderam fluorescência. Após adição de glucose, 46,5% das células apresentaram capacidade de extrudir a cF acumulada, já nas células stressadas com 160 mg/ml de extracto durante 1

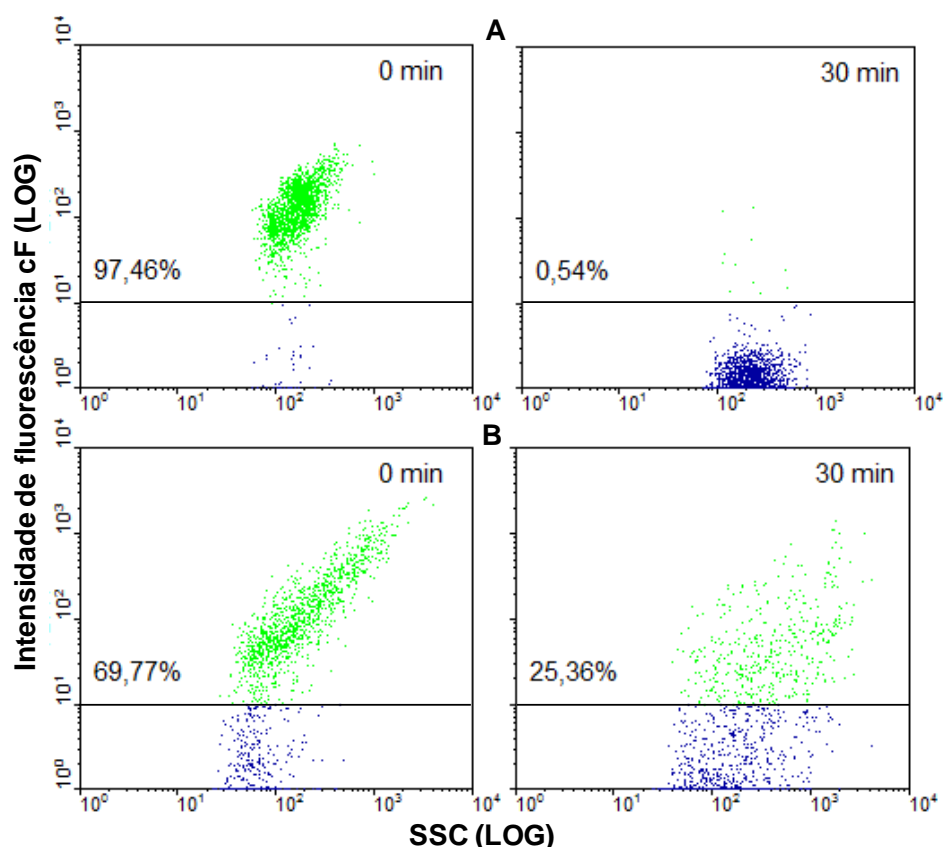
hora, apenas 36,5% da população perdeu a fluorescência por expulsão do composto. Estes resultados sugerem que o crescimento das células de *S. aureus* na presença de extracto de *V. cylindraceum* não representou uma vantagem para as células quando estas foram sujeitas a concentrações superiores mas, pelo contrário, tornaram-se mais vulneráveis (anexo III, quadro 6 e 7).



**Figura 4.11.** Análise por CMF do efluxo de cF em células de *S. aureus* marcadas por incubação com 50  $\mu$ M cFDA. O efluxo de cF foi medido em suspensão de células (em tampão NaPi, 50 mM, pH 7,4) energizadas com glucose (símbolos preenchidos) e desenergizadas (símbolos não preenchidos), em células crescidas na presença de 60 mg/ml de extracto durante 10h (controlo), e posteriormente stressadas com 160 mg/ml de extracto aquoso durante 1h.

#### 4.6. Difusão de cF induzida por *V. cylindraceum*

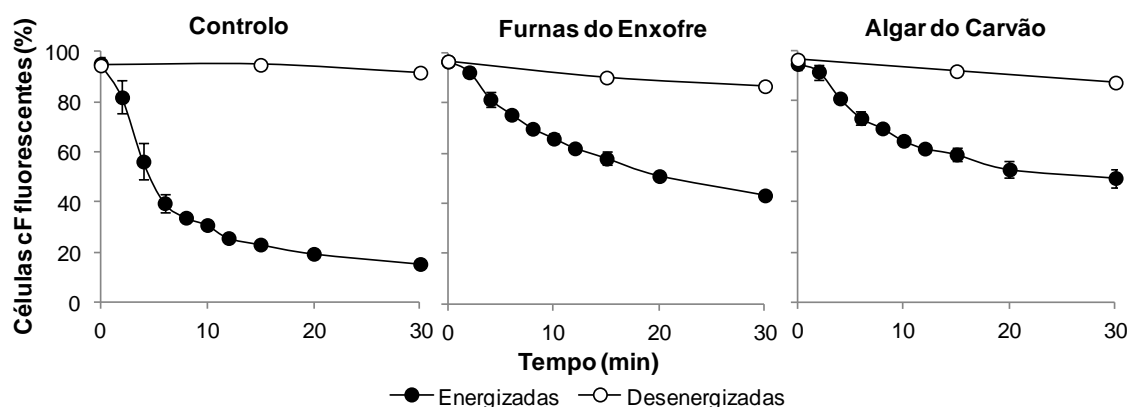
As células de *S. aureus* crescidas sem extracto e marcadas com cF, quando foram incubadas em tampão sem extracto, retiveram eficientemente cF (dados mostrados na figura 4.10), no entanto, quando foram expostas a 160 mg/ml de extracto durante 30 minutos, perderam o composto por difusão passiva, como se pode verificar a partir da diminuição da intensidade de fluorescência. Menos de 1% das células foram consideradas cF fluorescentes (figura 4.12A). Em células crescidas na presença de extracto e marcadas com cF, verificou-se que após a incubação dessas células com 160 mg/ml de extracto durante 30 minutos, foi possível distinguir duas sub-populações, uma das quais perdeu o composto por difusão passiva e a outra capaz de reter a cF de forma eficiente (25,36%) (figura 4.12B). A análise multiparamétrica revelou, assim, que a população de *S. aureus* é heterogénea em relação à resistência ao extracto de *V. cylindraceum* com base na capacidade de retenção de cF.



**Figura 4.12.** Análise por CMF do efluxo de cF em células de *S.aureus* induzido pelo extracto de *V. cylindraceum*. Dotplots de SSC vs FL1 de suspensão de células desenergizadas (em tampão NaPi 50 mM, pH 7,4) marcadas com cF e incubadas a 37 °C na presença de 160 mg/ml de extracto. As amostras foram retiradas imediatamente após a adição de extracto e passados 30 min de incubação. A retenção de cF foi analisada em células crescidas na ausência (A) e presença de 60 mg/ml de extracto aquoso (B).

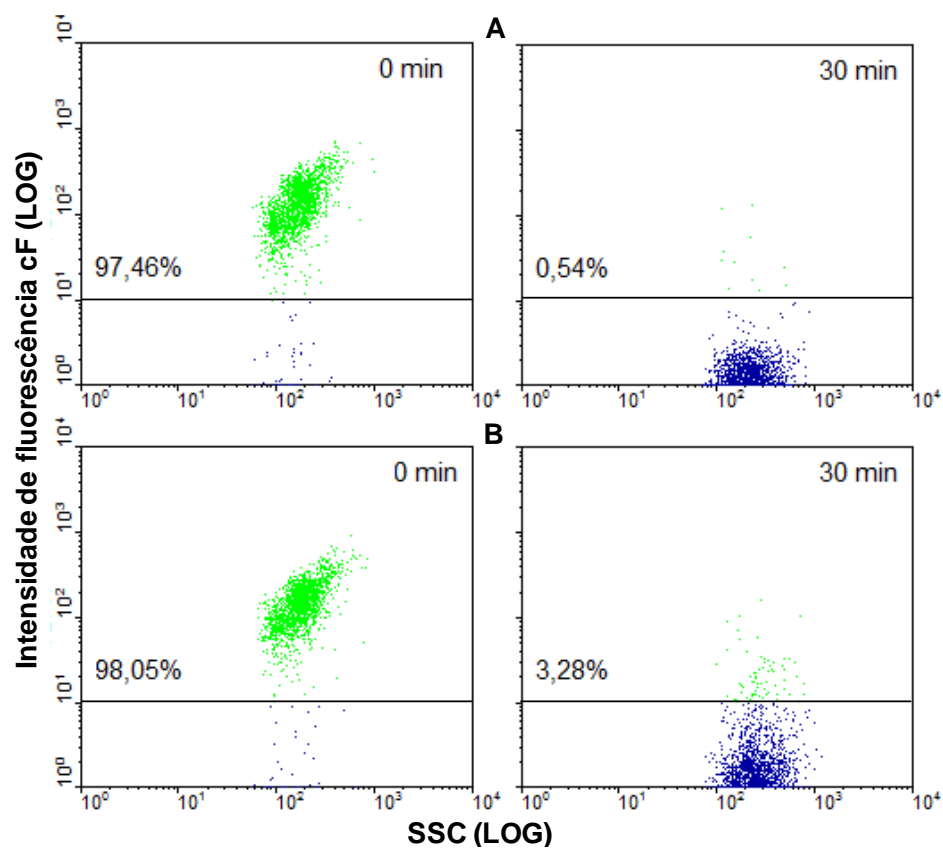
#### 4.7. Efeito do local de crescimento das bagas de *V. cylindraceum* na actividade observada

De modo a verificar se o local de crescimento das bagas tinha alguma influência no stress provocado pelo extracto de *V. cylindraceum* nas células de *S. aureus*, testaram-se extractos de bagas provenientes de duas localizações, Furnas do Enxofre e Algar do Carvão. No que se refere à actividade metabólica, avaliada pela capacidade das células extrudirem a cF após serem energizadas (figura 4.13), não se verificaram diferenças entre os dois tipos de bagas. Quando não energizadas, verificou-se um decréscimo na percentagem de células que retinham a cF, de 9,93% e 9,11% após tratamento com extracto proveniente das Furnas do Enxofre e do Algar do Carvão, respectivamente (anexo III, quadro 8 e 9).



**Figura 4.13.** Análise por CMF do efluxo de cF em células de *S.aureus* marcadas por incubação a 37°C com 50  $\mu$ M cFDA. O efluxo de cF foi medido em suspensão de células (em tampão NaPi, 50 mM, pH 7,4) energizadas com glucose (símbolos preenchidos) e desenergizadas (símbolos não preenchidos), em células não stressadas (controlo), e células stressadas durante 1h, com 160 mg/ml de extracto aquoso proveniente das Furnas do Enxofre e do Algar do Carvão.

No que se refere ao efeito do extracto sobre a eficiência da membrana como barreira (figura 4.14), verificou-se que após 30 minutos de incubação na presença de 160 mg/ml de extracto, praticamente todas as células expostas ao extracto proveniente de bagas das Furnas do Enxofre perderam a cF por difusão passiva, ao contrário das células de *S. aureus* stressadas com extracto proveniente de bagas do Algar do Carvão, onde foi possível distinguir duas sub-populações, uma das quais foi capaz de reter a cF (3,28%) (figura 4.14B). Estes resultados sugerem que o extracto proveniente das Furnas do Enxofre induz uma maior permeabilização da membrana que o proveniente do Algar do Carvão.



**Figura 4.14.** Análise por CMF do efluxo de cF em células de *S.aureus* induzido pelo extracto de *V. cylindraceum*. Dotplots de SSC vs FL1 de suspensão de células desenergizadas (em tampão NaPi 50 mM, pH 7,4) marcadas com cF e incubadas a 37 °C na presença de 160 mg/ml de extracto. As amostras foram retiradas imediatamente após a adição de extracto e passados 30 min de incubação. A retenção de cF foi analisada em células tratadas com 160 mg/ml de extracto proveniente das Furnas do Enxofre (A) e do Algar do Carvão (B).

## 5. DISCUSSÃO

Existem vários estudos que demonstram a actividade antimicrobiana de várias espécies pertencentes ao Género *Vaccinium* (Rauha *et al.*, 2000; Magariños *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008; Akroum *et al.*, 2009; Burdulis *et al.*, 2009), neste sentido avaliou-se a actividade antimicrobiana do extracto aquoso de bagas de *Vaccinium cylindraceum*, uma espécie endémica dos Açores, em relação a um microrganismo de origem alimentar, o *Staphylococcus aureus*. Ao contrário destes estudos, que utilizam técnicas de microbiologia clássica, que se baseiam no crescimento da população e cujos resultados são expressos como uma média da cultura como um todo, pressupondo que cada célula contribui de igual forma para o fenómeno observado, no presente trabalho utilizou-se a citometria de fluxo (CMF), que permite avaliar a actividade antimicrobiana em células individuais de *S. aureus*.

Quando se considera a sobrevivência de microrganismos expostos a diferentes factores de stress, a heterogeneidade de estados metabólicos e fisiológicos existentes numa população microbiana revela-se, uma vez que nem todas as células sobrevivem de igual forma quando sujeitas a condições que representam um desafio para a célula (Jordan *et al.*, 1999; Booth, 2002). Os resultados obtidos mostram que a análise multiparamétrica por CMF de duas características fisiológicas em simultâneo, a actividade esterásica e a permeabilidade da membrana, avaliadas pela combinação de carboxifluoresceína (cF) e iodeto de propídio (IP) permite a distinção de três estados fisiológicas em células de *S. aureus* como resultado da exposição a *V. cylindraceum*: células saudáveis, marcadas apenas com cF, células com membrana danificada, marcadas apenas com IP, e células permeáveis, marcadas com ambas as moléculas fluorescentes.

Assume-se que a marcação das células com fluorocromos que se ligam aos ácidos nucleicos, como o IP, exigem que a membrana plasmática esteja de tal forma danificada que as células se encontram mortas (Weisenthal e Lippman, 1985; Roth *et al.*, 1997), e consequentemente incapazes de serem marcadas com cF (Deere *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 1989). No entanto, a população de



células de *S. aureus* duplamente marcadas com cF e IP, observadas no presente trabalho, demonstra que estas suposições são demasiado simplistas. Noutros trabalhos também se observaram populações IP-cF duplamente marcadas de células de bifidobactérias sujeitas a sais biliares (Ben Amor *et al.*, 2002), de *Oenococcus oeni* stressadas com etanol (da Silveira *et al.*, 2002), e *Lactobacillus rhamnosus* expostos a tratamento por altas pressões (Ananta e Knorr, 2009). Estes resultados suportam a ideia de que os testes de exclusão de fluorocromos devem ser concebidos para reflectir a complexidade do fenómeno que está a ser investigado e não para estimar a morte celular (Joux *et al.*, 2000; Novo *et al.*, 2000; Shapiro, 2000; da Silveira *et al.*, 2002), especialmente se a membrana plasmática for um dos alvos atingidos pelo factor de stress em estudo.

A presença de células duplamente marcadas é indicadora dum estado fisiológico que poderá corresponder a células que se encontram no estado “viável não culturável” (Paparella *et al.*, 2008), o que explica o facto de a percentagem de células cF-fluorescentes ser superior às ufc obtidas a partir destas células. Na população de *S. aureus* que cresceu na presença de extracto de *V. cylindraceum*, o tamanho desta sub-população de células num estado fisiológico intermédio representou praticamente metade da população, que apesar de poderem ter perdido a capacidade de se dividir, podem excretar metabolitos tóxicos ou deteriorantes dos alimentos, pelo facto de se manterem metabolicamente activas (Ananta *et al.*, 2004). Além disso, esta sub-população de células lesadas é de particular importância, uma vez que se tiver a possibilidade de recuperar, poderá tornar-se crítica em termos de segurança alimentar.

A carboxifluoresceína diacetato (cFDA) é convertida em cF por enzimas citoplasmáticas funcionais, as esterases. A pH fisiológico a cF encontra-se carregada negativamente, acumulando-se no interior de células que possuam uma membrana plasmática intacta. A extrusão da cF acumulada intracelularmente é um processo dependente de energia (Breeuwer *et al.*, 1994), que exige transportadores de membrana com afinidade para a cF, tal como se verificou para *Saccharomyces cerevisiae* (Breeuwer *et al.*, 1994), *Lactococcus lactis* (Bunthof *et al.*, 1999) e *O. oeni* (da Silveira *et al.*, 2009). As

células de *S. aureus* carregadas com cF quando energizadas com glucose extrudiram activamente a cF acumulada, indicativo de que *S. aureus* tem um sistema de transporte dependente de energia que reconhece a cF. Bunthof *et al.* (1999) observaram que as células de *L. lactis* continuavam a extrudir activamente a cF após a dissipação da força protomotriz por Valinomicina e Nigericina, sugerindo que o efluxo de cF ocorre através de um sistema de transporte primário dependente do ATP. Assim, a extrusão activa de cF revelou-se um bom indicador do estado metabólico das células de *S. aureus* e da sua capacidade de sintetizar ATP. Após exposição a 160 mg/ml de extracto aquoso de *V. cylindraceum* durante 1 hora, as células de *S. aureus* foram menos eficientes a extrudir cF, o que poderá reflectir uma menor capacidade de gerar energia metabólica. Uma vez que o *S. aureus* é aeróbio, a síntese de ATP é dependente do gradiente de membrana, pelo que a incapacidade de células stressadas com extracto expulsarem eficientemente a cF, pode dever-se a uma dissipação do gradiente.

Neste sentido avaliou-se o efeito do extracto de *V. cylindraceum* na permeabilidade da membrana plasmática das células de *S. aureus*, tendo-se verificado que a suspensão de células desenergizadas e marcadas com cF perdeu a fluorescência ao fim de 30 minutos de incubação na presença de 160 mg/ml de extracto de *V. cylindraceum*, indicando que a cF deixou as células por difusão passiva, como resultado da permeabilização da membrana plasmática. Estes dados fornecem fortes indicações de que a perda da capacidade das células de *S. aureus* stressadas em extrudir eficientemente a cF se deve, pelo menos em parte, à dissipação do gradiente de membrana com consequente inibição da fosforilação oxidativa. Num trabalho realizado com várias estirpes de *S. aureus* verificou-se que o concentrado de *Vaccinium macrocarpon* provocava a perda da integridade, não só da membrana plasmática, como da parede celular das estirpes estudadas (Wu *et al.* 2008).

No presente trabalho, comparou-se a actividade de extractos de bagas da mesma espécie, *V. cylindraceum*, mas crescidas em diferentes locais, ambos com actividade vulcânica, i.e., Furnas do Enxofre e Algar do Carvão, tendo-se verificado que as células de *S. aureus* sujeitas ao extracto de bagas do Algar do Carvão apresentaram uma sub-população que foi capaz de manter a

integridade da membrana, apesar deste extracto possuir um valor de pH menor que o das Furnas do Enxofre (2,75 e 2,92, respectivamente). Estes resultados sugerem que o crescimento em solos mais ricos em enxofre (bagas provenientes das Furnas) torna o extracto mais rico em compostos capazes de desorganizar a membrana. No entanto, é interessante a constatação de que não foram observadas diferenças ao nível da actividade metabólica para ambos os extractos.

Hoje sabe-se que a sobrevivência de bactérias numa variedade de condições potencialmente letais pode ser conseguida através da pré-exposição das células a condições sub-letais do mesmo tipo de stress (para uma revisão Clements e Foster, 1999). Neste trabalho, é demonstrado que esta aquisição da tolerância é um fenómeno observado não ao nível da população, mas ao nível das células individuais. O crescimento das células na presença 60 mg/ml de extracto resultou numa sub-população de células mais robusta, que mantém a capacidade de reter a cF durante a exposição a concentrações mais elevadas de extracto. A análise por CMF destas células mostrou que a população de *S. aureus* é heterogénea em relação à adaptação ao extracto, pois nem todas as células desenvolveram um mecanismo que aumentou a eficiência de sua membrana citoplasmática como uma barreira, ou seja, apenas uma sub-população (25,36%) foi capaz de reter a cF, quando exposta a 160 mg/ml de extracto de *V. cylindraceum*.

No entanto, estas células crescidas na presença de extracto, quando foram testadas para a sua capacidade de extrudir a cF acumulada intracelularmente, após a incubação na presença de 160 mg/ml de extracto de *V. cylindraceum* durante 1 hora, não recuperaram a capacidade de extrudir eficientemente a cF quando energizadas com glucose. Estes resultados sugerem que outros mecanismos de inibição devem estar envolvidos para além da dissipação do gradiente de membrana.

Na utilização de extractos naturais como conservantes alimentares, é de esperar que estes sejam adicionados em pequenas quantidades devido à sua influência sobre as propriedades organolépticas, o que pode favorecer o desenvolvimento de estirpes tolerantes aos compostos naturais com

capacidade de sobreviverem e crescerem nos alimentos. Neste sentido, o facto das células de *S. aureus* não terem revelado uma resposta adaptativa ao extracto aquoso de *V. cylindraceum*, no que se refere à sua capacidade de gerar energia metabólica, é um aspecto bastante positivo na perspectiva da sua utilização como conservante natural.

Este trabalho mostra claramente que o extracto de *V. cylindraceum* danifica a membrana citoplasmática de *S. aureus*, avaliada pela incapacidade das células stressadas em reter a cF eficientemente. A utilização deste extracto, em combinação com outras barreiras de conservação, poderá ser útil uma vez que o dano celular induzido pelo extracto poderá exponenciar a acção de tratamentos subsequentes, como seja a aplicação de alta pressão ou facilitar a entradas de moléculas com actividade antimicrobiana.

## 6. CONCLUSÃO

O extracto de *Vaccinium cylindraceum* afecta a actividade metabólica das células de *Staphylococcus aureus*, verificada pela perda de eficiência a extrudir a carboxifluoresceína (cF) acumulada intracelularmente quando energizadas com glucose.

Este trabalho mostra claramente que o extracto de *V. cylindraceum* danifica a membrana citoplasmática de *S. aureus*, avaliada pela incapacidade das células desenergizadas em reter a cF eficientemente na presença do extracto. O local onde as bagas foram colhidas afecta o efeito observado.

A análise multiparamétrica por citometria de fluxo (CMF) de células de *S. aureus* crescidas na presença de extracto revelou que a população é heterogénea quanto à sua tolerância ao extracto de *V. cylindraceum*, tendo-se observado uma sub-população que se tornou mais robusta sendo capaz de reter eficientemente a cF. No entanto, esta resposta adaptativa não foi evidente no que se refere à actividade metabólica destas células.

A utilização de dois marcadores fluorescentes, a cF e o iodeto de propídio (IP), em combinação com a CMF, permite não só discriminar entre células vivas (cF-fluorescentes) e mortas (IP-fluorescentes), como também quantificar uma sub-população danificada que perdeu a viabilidade mas que se mantém metabolicamente activa.

Além do interesse fundamental subjacente à elucidação dos mecanismos envolvidos na resposta ao stress e adaptação de *S. aureus* ao extracto de *V. cylindraceum* alcançados no presente trabalho, fornecemos um método rápido para avaliar o estado fisiológico de células individuais de *S. aureus*, o que representa uma técnica poderosa para a indústria alimentar.

## 7. BIBLIOGRAFIA

Adams, MR, Moss, MO. (2008). Food Microbiology. Third Edition. The Royal Society of Chemistry, UK.

Agatemor, C. (2009). Antimicrobial activity of aqueous and ethanol extracts of nine Nigerian spices against four food borne bacteria. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry 8: 195-200.

Akroum, S, Satta, D, Lalaoui, K. (2009). Antimicrobial, antioxidant, cytotoxic activities and phytochemical screening of some Algerian plants. European Journal of Scientific Research 31: 289-295.

Álvarez-Barrientos, A, Arroyo, J, Cantón, R, Nombela, C, Sánchez-Pérez, M. (2000). Applications of flow cytometry to clinical microbiology. Clinical Microbiology Reviews 13: 167-195.

Ananta, E, Heinz, V, Knorr, D. (2004). Assessment of high pressure induced damage on *Lactobacillus rhamnosus* GG by flow cytometry. Food Microbiology 21: 567-577.

Ananta, E, Knorr, D. (2009). Comparison of inactivation pathways of thermal or high pressure inactivated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103 by flow cytometry analysis. Food Microbiology 26: 542-546.

Arroyo, G, Sanz, PD, Préstamo, G. (1999). Response to high-pressure, low-temperature treatment in vegetables: determination of survival rates of microbial populations using flow cytometry and detection of peroxidase activity using confocal microscopy. Journal of Applied Microbiology 86: 544-556.

Beales, N. (2004). Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 3: 1-20.

Ben Amor, K, Breeuwer, P, Verbaarschot, P, Rombouts, FM, Akkermans, ADL, De Vos, WM, Abee, T. (2002). Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead *Bifidobacterium* cells during bile salt stress. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5209-5216.

Booth, IR. (2002). Stress and the single cell: Intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *International Journal of Food Microbiology* 78: 19-30.

Bower, CK, Daeschel, MA. (1999). Resistance responses of microorganisms in food environments. *International Journal of Food Microbiology* 50: 33-44.

Breeuwer, P, Drocourt, JL, Rombouts, FM, Abee, T. (1994). Energy-dependent, carrier-mediated extrusion of carboxyfluorescein from *Saccharomyces cerevisiae* allows rapid assessment of cell viability by flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1467-1472.

Breeuwer, P, Abee, T. (2000). Assessment of viability of microorganisms employing fluorescent techniques. *International Journal of Food Microbiology* 55: 193-200.

Brehm-Stecher, BF, Johnson, EA. (2003). Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol and apritone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 3357-3360.

Brul, S, Coote, P. (1999). Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology* 50: 1-17.

Brul, S, Coote, P, Oomes, S, Mensonides, F, Hellingwerf, K, Klis, F. (2002). Physiological actions of preservative agents: prospective of use of modern microbiological techniques in assessing microbial behaviour in food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 79: 55-64.

- Bunthof, CJ, van den Braak, S, Breeuwer, P, Rombouts, FM, Abee, T. (1999). Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3681-3689.
- Bunthof, CJ, van den Braak, S, Breeuwer, P, Rombouts, FM, Abee, T. (2000). Fluorescence assessment of *Lactococcus lactis* viability. *International Journal of Food Microbiology* 55: 291-294.
- Bunthof, CJ, Bloemen, K, Breeuwer, P, Rombouts, FM, Abee, T. (2001). Flow cytometric assessment of viability of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2326-2335.
- Burdulis, D., Sarkinas, A., Jasutienė, I., Stackevicienė, E., Nikolajevs, L., and Janulis, V. (2009). Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research* 66: 399-408.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223-253.
- Busta, FF. (1976). Practical implications of injured microorganisms in food. *Journal of Milk and Food Technology* 39: 138-145.
- Casp, A, Abril, J. (1999). *Procesos de Conservación de Alimentos*. A. Madrid, Ediciones e Ediciones Mundi-Prensa.
- Chang, HW. (1995). Antibacterial effect of spices and vegetables. *Food Industries* 27: 53-61.
- Clements, MO, Foster, SJ. (1999). Stress resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology* 7: 458-462.
- Comas, J, Vives-Rego, J. (1998). Enumeration, viability and heterogeneity in *Staphylococcus aureus* cultures by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods* 32: 45-53.



- Comas-Riu, J, Rius, N. (2009). Flow cytometry applications in the food industry. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36: 999-1011.
- Cowan, MM. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564-582.
- Cox, SD, Mann, CM, Markham, JL, Bell, HC, Gustafson, JE, Warmington, JR, Wyllie; SG. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88: 170-175.
- Cushnie, TPT, Lamb, AJ. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26: 343-356.
- Czechowska, K, Johnson DR, van der Meer, JR. (2008). Use of flow cytometric methods for single-cell analysis in environmental microbiology. *Current Opinion in Microbiology* 11: 205-212.
- da Silveira, MG, San Romão, MV, Loureiro-Dias, MC, Rombouts, FM, Abee, T. (2002). Flow cytometric assessment of membrane integrity of ethanol-stressed *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 6087-6093.
- da Silveira, MG, Abee, T. (2009). Activity of ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells: a flow cytometric approach. *Journal of Applied Microbiology* 106: 1690-1696.
- Davey, HM, Kell, D. (1996). Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analysis. *Microbiological Reviews* 60: 641-696.
- Davey, HM, Winson, MK. (2003). Using flow cytometry to quantify microbial heterogeneity. *Current Issues in Molecular Biology* 5: 9-15.
- Deere, D, Shen, J, Vesey, G, Bell, P, Bissinger, P, Veal, D. (1998). Flow cytometry and cell sorting for yeast viability assessment and cell selection. *Yeast* 14: 147-160.
- Del Campo, J, Amiot, MJ, Nguyen, C. (2000). Antimicrobial effect of rosemary extracts. *Journal of Food Protection* 63: 1359-1369.

Dorman, HJD, Deans, SG. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88: 308-316.

Doughari, JH, Human, IS, Bennade, S, Ndakidemi, PA. (2009). Phytochemicals as chemotherapeutic agents and antioxidants: Possible solution to the control of antibiotic resistant verocytotoxin producing bacteria. *Journal of Medicinal Plants Research* 3: 839-848.

Farr, SB, Kogoma, T. (1991). Oxidative stress response in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiological Reviews* 55: 561-585.

Fitzgerald, DJ, Stratford, M, Gasson, MJ, Ueckert, J, Bos, A, Narbad, A. (2004). Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *Journal of Applied Microbiology* 97: 104-113.

Freeman-Cook, L, Freeman-Cook, K. (2006). *Staphylococcus aureus* infections. Chelsea House Publishers, USA.

Gunasekera, TS, Attfield, PV, Veal, DA. (2000). A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1228-1232.

Hengge-Aronis, R. (1999). Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Current Opinion in Microbiology* 2: 148–152.

Hsieh, (2000). Antimicrobial effect of cinnamon extract. *Taiwanese Journal of Agricultural Chemistry and Food Science* 38: 184-193.

Hsieh, P, Mau, J, Huang, S. (2001). Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. *Food Microbiology* 18: 35-43.

Hugo, W.B. (1978). Membrane-active antimicrobial compounds – a reappraisal of their mode of action in the light of the chemiosmotic theory. *International Journal of Pharmaceutics* 1: 127–131.

Hurst, A. (1977). Bacterial injury: a review. *Canadian Journal of Microbiology* 23: 935-944.

Hurst, A. (1984). Revival of vegetative bacteria after sublethal heating, in Andrew, MHE, Russell, AD. (Ed.), *The revival of injured microbes*. Academic Press, London.

Jay, JM. (2000). *Modern food microbiology*. Sixth Edition. Aspen Publishers, USA.

Jepras, RI, Carter, J, Pearson, SC, Paul, FE, Wilkinson, MJ. (1995). Development of a robust flow cytometric assay for determining numbers of viable bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2696-2701.

Johnson, EA. (2003). Microbial adaptation and survival in foods, In Yousef AF, Juneja VJ. (Ed.). *Microbial stress adaptation and food safety*. CRC Press. Boca Raton, USA.

Jordan, SL, Glover, J, Malcolm, L, Thompson-Carter, FM, Booth, IR, Park, SF. (1999). Augmentation of killing of *Escherichia coli* O157 by combinations of lactate, ethanol, and low-pH conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1308-1311.

Joux, F, Lebaron, P. (2000). Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes and Infection* 2: 1523-1535.

Juven, BJ, Kanner, J, Schved, F, Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Microbiology* 76: 626–631.

Kell, DB, Ryder, HM, Kaprelyants, AS, Westerhoff, HV. (1991). Quantifying heterogeneity: flow cytometry of bacterial cultures. *Antoine van Leeuwenhoek* 60: 145-158.

Kivanc, M, Akgul, A, Dogan, A. (1991). Inhibitory and stimulatory effects of cumin, oregano and their essential oils on growth and acid production of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides*. International Journal of Food Microbiology 13: 81–86.

Lacombe, A, Wu, VCH, Tyler, S, Edwards, K. (2010). Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against *Escherichia coli* O157:H7. International Journal of Food Microbiology 139: 102-107.

Levy, SB. (2002). Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement 92: 65-71.

Lushchak, VI. (2001). Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. Biochemistry (Moscow) 66: 592-609.

Magariños, HLE, Sahr, C, Selaive, SDC, Costa, ME, Figuerda, FE, Pizarro, OA. (2008). In vitro inhibitory effect of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) juice on pathogenic microorganisms. Applied Biochemistry and Microbiology 44: 300-304.

Maillard, JY. (2002). Bacterial target sites for biocide action. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement 92: 16-27.

Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by chemiosmotic type of mechanism. Nature, London 191: 144–148.

Mitchell, P. (1972). Chemiosmotic coupling in energy transduction: a logical development of biochemical knowledge. Journal of Bioenergetics 3: 5–24.

Molenaar, D, Bolhuis, H, Abee, T, Poolman, B, Konings, WN. (1992). The efflux of a fluorescent probe is catalyzed by an ATP-driven extrusion system in *Lactococcus lactis*. Journal of Bacteriology 174: 3118-3124.

- Muñoz, M, Guevara, L, Palop, A, Tabera, J, Fernández, PS. (2009). Determination of the effect of plant essential oils obtained by supercritical fluid extraction on the growth and viability of *Listeria monocytogenes* in broth and food systems using flow cytometry. *LWT – Food Science and Technology* 42: 220-227.
- Murano, EA, Pierson, MD. (1993). Effect of heat shock and incubation atmosphere on injury and recovery of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection* 55: 568-572.
- Nebe-von-Caron, G, Stephens, PJ, Hewitt, CJ, Powell, JR, Badley, RA. (2000). Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting 42: 97-114.
- Nohynek LJ, Alakomi H, Kähkönen MP, Heinonen M, Helander IM, Oksman-Caldentey KM, Puupponen-Pimiä RH. (2006). Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and Cancer* 54: 18-32.
- Novo, DJ, Perlmutter, NG, Hunt, RH, Shapiro, HM. (2000). Multiparameter flow cytometric analysis of antibiotic effects on membrane potential, membrane permeability, and bacterial counts of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44: 827-834.
- Pandit, VA, Shelef, LA. (1994). Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Microbiology* 11: 57-63.
- Paparella, A, Taccogna, L, Aguzzi, I, Chaves-López, C, Serio, A, Marsilio, F, Suzzi, G. (2008). Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 19: 1174-1182.
- Puupponen-Pimiä, R, Nohynek, L, Meier, C, Kähkönen, M, Heinonen, M, Hopia, A, Oksman-Caldentey, KM. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology* 90: 494-507.

Puupponen-Pimiä, R, Nohynek, L, Alakomi, H, Oskman-Caldentey, KM. (2005a). Bioactive berry compounds – novel tools against human pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67: 8–18.

Puupponen-Pimiä, R, Nohynek, L, Hatmann-Schmidlin, S, Kähkönen, M, Heinonen, M, Määttä-Riihinen, K, Oskman-Caldentey, KM. (2005b). Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *Journal of Applied Microbiology* 98: 991-1000.

Rahbar, M, Diba, K. (2010). In vitro activity of cranberry extract against etiological agents of urinary tract infections. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 4: 286-288.

Rahman, MS. (2007). Food preservation: overview, in: Rahman, MS. (Ed.), *Handbook of food preservation*. Second Edition. CRC Press, Boca Raton, USA.

Rauha, JP, Remes, S, Heinonen, M, Hopia, A, Kähkönen, M, Kujala, T, Pihlaja, K, Vuorela, H, Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effects of Finish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology* 56: 3-12.

Ray, B. (2005). *Fundamental food microbiology*. Third Edition. CRC Press, Boca Raton, USA.

Ritz, M, Tholozan, JL, Federighi, M, Pilet, MF. (2001). Morphological and physiological characterization of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2240-2247.

Ross, DD, Joneckis, CC, Ordonez, JV, Sisk, AM, Wu RK, Hamburger, AW, Nora, RE. (1989). Estimation of cell survival by flow cytometric quantification of fluorescein diacetate/propidium iodide viable cell number. *Cancer Research* 49: 3776-3782.

Roth, B, Poot, M, Yue, S, Millard, PJ. (1997). Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with Sytox Green nucleic acid stain. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2421-2431.

Russell, AD. (1984). Potential sites of damage in microorganisms exposed to chemical or physical agents, in Andrew, MHE, Russell, AD. (Ed.), The revival of injured microbes. Academic Press, London.

Russell, AD, Day, MJ. (1996). Antibiotic and biocide resistance in bacteria. Microbios 85: 45-65.

Santos-Buelga, C, Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. Journal of the Science of Food and Agriculture 80: 1094-1117.

Schäfer, H. (2002). Flora of the Azores. A Field Guide. Margraf Verlag.

Schenk, M, Raffellini, S, Guerrero, S, Blanco, GA, Alzamora, SM. (2011). Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria innocua* and *Saccharomyces cerevisiae* by UV-C light: study of cell injury by flow cytometry. LWT – Food Science and Technology 44: 191-198.

Shapiro, HM. (2000). Microbial analysis at the single-cell level: tasks and techniques. Journal of Microbiological Methods 42: 3-16.

Smid, EJ, Gorris, LGM. (2007). Natural antimicrobials for food preservation, in: Rahman, MS. (Ed.), Handbook of food preservation. Second Edition. CRC Press, USA.

Smith-Palmer, A, Stewart, J, Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Letters in Applied Microbiology 26: 118-122.

Vattem, DA, Ghaedian, R, Shetty, K. (2005). Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition 14: 120-130.

Veal, DA, Deere, D, Ferrari, B, Piper, J, Attfield, PV. (2000). Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. Journal of Immunological Methods 243: 191-210.

- Weisenthal, LM, Lippman, ME. (1985). Clonogenic and non-clonogenic in vitro chemosensitivity assays. *Cancer Treatment Reports* 69: 615-632.
- Wen, A, Delaquis, P, Stanich, K, Toivonen, P. (2003). Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiology* 20: 305-311.
- Wesche, AM, Gurther, JB, Marks, BP, Ryser, ET. (2009). Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *Journal of Food Protection* 72: 1121-1138.
- Wu, VCH, Qiu, XJ, Bushway, A, Harper, L. (2008). Antibacterial effects of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) concentrate on foodborne pathogens. *LWT Food Science and Technology* 41: 1834–1841.
- Wu, VCH, Qiu, XJ, de los Reyes, BG, Lin, CS, Pan, YP. (2009). Application of cranberry concentrate (*Vaccinium macrocarpon*) to control *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef and its antimicrobial mechanism related to the down regulated slp, hdeA and cfa. *Food Microbiology* 26: 32–38.
- Yousef, AE, Courtney, PD. (2003). Basics of stress adaptation and implications in new-generation foods, In Yousef AF, Juneja VJ. (Ed.). *Microbial stress adaptation and food safety*. CRC Press. Boca Raton, USA.
- Zheng, W, Wang, SY. (2003). Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 502-509.



## 8. ANEXOS

### ANEXO I – Resultados de fluorescência de cF e IP

**Quadro 1.** Efeito do extracto aquoso de *V. cylindraceum* em células de *S. aureus* avaliado pela retenção de cF e exclusão de IP. As células foram crescidas na ausência e na presença de 60 mg/ml de extracto, recolhidas por centrifugação, lavadas com tampão NaPi 50 mM (pH 7,4) e stressadas com 160 mg/ml de extracto durante 1 h.

	Crescimento na ausência de extracto		Crescimento na presença de extracto	
	Controlo	Stressadas	Controlo	Stressadas
<b>Células cF fluorescentes (%)</b>	97,6	90,1	72,16	69,45
<b>Células IP fluorescentes (%)</b>	1,3	4,6	78,93	83,34

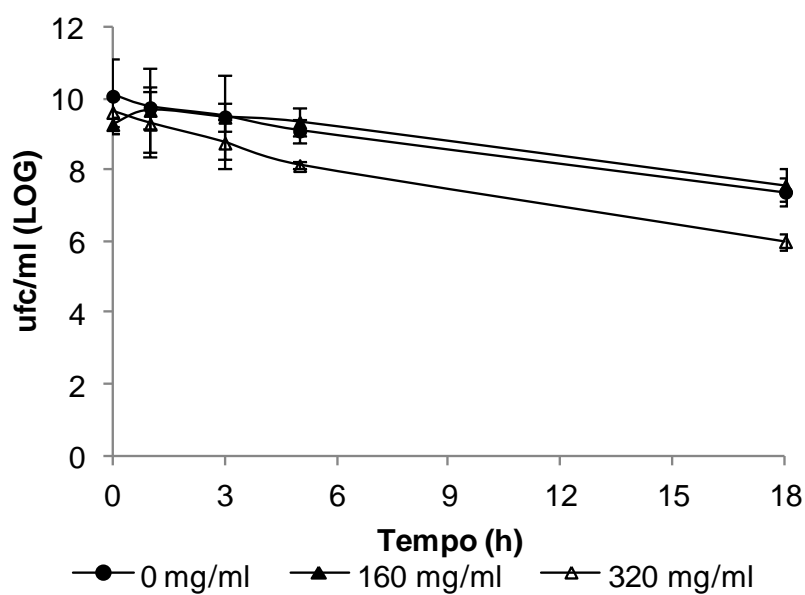
**Quadro 2.** Efeito do extracto aquoso de *V. cylindraceum* no crescimento de *S. aureus*, expresso em percentagem de células marcadas com cF e IP. Os valores obtidos foram utilizados para comparação com as contagens em placa.

Tempo (h)	0 mg/ml		160 mg/ml		320 mg/ml	
	cF	IP	cF	IP	cF	IP
<b>1</b>	94,0	1,3	90,1	3,9	96,3	17,1
<b>3</b>	92,73	10,65	90,12	12,31	96,28	23,21
<b>5</b>	93,13	17,03	94,68	10,67	95,87	21,93
<b>18</b>	39	34	71,55	29,23	9,43	92,69

## ANEXO II – Contagem em placa

**Quadro 3.** Efeito do extracto aquoso de *V. cylindraceum* no crescimento de *S. aureus*, expresso em log<sub>10</sub> ufc/ml.

Tempo (h)	0 mg/ml	Desvio padrão	160 mg/ml	Desvio padrão	320 mg/ml	Desvio padrão
0	10,08	1,04	9,28	0,23	9,62	0,42
1	9,76	0,58	9,68	1,20	9,29	0,94
3	9,5	1,19	9,49	0,38	8,76	0,68
5	9,10	0,35	9,35	0,39	8,13	0,10
18	7,39	0,40	7,56	0,46	6	0,21



**Figura 1.** Efeito do extracto de *V. cylindraceum* na viabilidade celular avaliada através da contagem do número de ufc/ml na condição de aplicação de 160 mg/ml e 320 mg/ml de extracto.

## ANEXO III – Resultados de fluorescência de cF

**Quadro 4.** Análise por CMF do efluxo de cF em células de *S.aureus* marcadas por incubação com 50  $\mu$ M cFDA. O efluxo de cF foi medido em suspensão de células (em tampão NaPi, 50 mM, pH 7,4) energizadas com glucose, não stressadas (controlo), e células stressadas com 160 mg/ml e 320 mg/ml de extracto aquoso durante 1h.

Tempo (min)	Controlo		160 mg/ml		320 mg/ml	
	Células cF fluorescentes (%)	Desvio padrão	Células cF fluorescentes (%)	Desvio padrão	Células cF fluorescentes (%)	Desvio padrão
0	95,16	2,66	96,72	1,09	92,73	2,15
2	81,77	6,54	92,46	2,08	89,87	0,44
4	56,16	7,16	81,61	2,99	85,92	0,25
6	39,56	3,61	75,51	1,56	76,22	2,14
8	33,76	1,21	69,91	0,76	67,77	0,88
10	30,83	0,62	65,96	2,08	64,78	2,66
12	25,63	1,07	62,10	0,67	62,23	3,86
15	23,04	0,76	58,00	2,76	62,32	0,22
20	19,35	1,49	51,03	1,42	59,17	1,24
30	15,29	0,92	43,32	1,73	56,74	1,72

**Quadro 5.** Análise por CMF do efluxo de cF em células de *S.aureus* marcadas por incubação com 50  $\mu$ M cFDA. O efluxo de cF foi medido em suspensão de células (em tampão NaPi, 50 mM, pH 7,4) desenergizadas, não stressadas (controlo), e células stressadas com 160 mg/ml e 320 mg/ml de extracto aquoso durante 1h.

Tempo (min)	Controlo		160 mg/ml		320 mg/ml	
	Células cF fluorescentes (%)	Desvio padrão	Células cF fluorescentes (%)	Desvio padrão	Células cF fluorescentes (%)	Desvio padrão
0	94,48	1,53	96,83	0,57	89,21	0,49
15	94,72	0,51	90,37	0,61	83,99	0,73
30	91,63	0,92	86,90	0,26	78,19	0,65

**Quadro 6.** Análise por CMF do efluxo de cF em células de *S.aureus* marcadas por incubação com 50  $\mu$ M cFDA. O efluxo de cF foi medido em suspensão de células (em tampão NaPi, 50 mM, pH 7,4) energizadas com glucose, crescidas na presença de 60 mg/ml de extracto durante 10h (controlo), e posteriormente stressadas com 160 mg/ml de extracto aquoso durante 1h.

Tempo (min)	Controlo		160 mg/ml	
	Células cF fluorescentes (%)	Desvio padrão	Células cF fluorescentes (%)	Desvio padrão
0	64,56	0,89	63,77	0,57
2	62,68	1,18	64,31	0,69
4	56,10	2,27	62,37	1,73
6	45,76	7,28	60,25	3,24
8	34,30	7,25	56,91	4,55
10	27,45	4,85	52,93	5,88
12	23,08	2,51	49,03	7,19
15	20,57	1,68	43,69	6,89
20	18,52	0,71	36,89	3,48
30	18,11	1,17	27,28	2,87

**Quadro 7.** Análise por CMF do efluxo de cF em células de *S.aureus* marcadas por incubação com 50  $\mu$ M cFDA. O efluxo de cF foi medido em suspensão de células (em tampão NaPi, 50 mM, pH 7,4) desenergizadas, crescidas na presença de 60 mg/ml de extracto durante 10h (controlo), e posteriormente stressadas com 160 mg/ml de extracto aquoso durante 1h.

Tempo (min)	Controlo		160 mg/ml	
	Células cF fluorescentes (%)	Desvio padrão	Células cF fluorescentes (%)	Desvio padrão
0	65,12	0,63	67,20	0,32
15	63,56	0,30	65,21	0,90
30	54,06	2,73	63,50	0,54

**Quadro 8.** Análise por CMF do efluxo de cF em células de *S.aureus* marcadas por incubação a 37°C com 50 µM cFDA. O efluxo de cF foi medido em suspensão de células (em tampão NaPi, 50 mM, pH 7,4) energizadas com glucose, não stressadas (controlo), e células stressadas durante 1h, com 160 mg/ml de extracto aquoso proveniente das Furnas do Enxofre e do Algar do Carvão.

Tempo (min)	Controlo		Furnas do Enxofre		Algar do Carvão	
	Células cF fluorescentes (%)	Desvio padrão	Células cF fluorescentes (%)	Desvio padrão	Células cF fluorescentes (%)	Desvio padrão
0	95,16	2,66	96,72	1,09	94,73	2,25
2	81,77	6,54	92,46	2,08	91,67	2,96
4	56,16	7,16	81,61	2,99	81,03	1,48
6	39,56	3,61	75,51	1,56	73,18	2,57
8	33,76	1,21	69,91	0,76	69,13	0,95
10	30,83	0,62	65,96	2,08	64,21	0,50
12	25,63	1,07	62,10	0,67	61,12	1,82
15	23,04	0,76	58,00	2,76	58,77	2,64
20	19,35	1,49	51,03	1,42	52,82	3,38
30	15,29	0,92	43,32	1,73	49,44	3,75

**Quadro 9.** Análise por CMF do efluxo de cF em células de *S.aureus* marcadas por incubação a 37°C com 50 µM cFDA. O efluxo de cF foi medido em suspensão de células (em tampão NaPi, 50 mM, pH 7,4) desenergizadas, não stressadas (controlo), e células stressadas durante 1h, com 160 mg/ml de extracto aquoso proveniente das Furnas do Enxofre e do Algar do Carvão.

Tempo (min)	Controlo		Furnas do Enxofre		Algar do Carvão	
	Células cF fluorescentes (%)	Desvio padrão	Células cF fluorescentes (%)	Desvio padrão	Células cF fluorescentes (%)	Desvio padrão
0	94,48	1,53	96,45	0,63	96,45	0,63
15	94,72	0,51	90,83	0,57	91,85	0,45
30	91,63	0,92	84,37	0,61	87,34	0,08